

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado: Biociencias y ciencias agroalimentarias

Título de la tesis:

Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de frutos rojos y bebidas elaboradas a partir de ellos.

Bioactive compounds and antioxidant activity of red fruits and beverages produced from them.

Director/Directores:

Julieta Mérida García

María Pérez Serratosa

Autor de la tesis:

María de los Ángeles Varo Santos

Fecha de depósito tesis en el Idep: 15 de noviembre de 2018

TITULO: *Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de frutos rojos y bebidas elaboradas a partir de ellos.*

AUTOR: *María de los Ángeles Varo Santos*

© Edita: UCOPress. 2019
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTOS ROJOS Y BEBIDAS ELABORADAS A PARTIR DE ELLOS

DOCTORANDO/A: M^a Ángeles Varo Santos

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

La citada Memoria de Tesis Doctoral se ha realizado utilizando la metodología adecuada y haciendo uso de las técnicas idóneas para culminar los objetivos previstos. Asimismo, la licenciada Varo Santos ha cumplido con las tareas encomendadas para la realización de su Tesis Doctoral. Desde su incorporación al Programa de Doctorado ha estado muy implicada en su proyecto de Tesis, tomando decisiones sobre su proyecto y adaptándose a las complicaciones generadas de él y mostrando en todo momento una alta dedicación e interés por el tema de trabajo, superando con creces los niveles de calidad científica exigibles para la obtención del Grado de Doctor. Durante su formación ha realizado varios cursos de formación para complementar su labor investigadora. Como consecuencia de los trabajos realizados, ha publicado un artículo derivado directamente de su trabajo de Tesis en una revista internacional indexada en el Journal Citation Report (JCR) y se han presentado numerosas comunicaciones en congresos, tanto nacionales como internacionales, algunas de ellas con capítulos de libros publicados. Además, debido a la colaboración en las tareas investigadoras del Grupo de Investigación posee otros artículos en revistas internacionales indexadas también en JCR.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 9 de noviembre de 2018

Firma de los directores

Fdo.: Julieta Mérida García

Fdo.: María Pérez Serratosa

ÍNDICE

Resumen/Abstract	1
Objetivos/Objectives	5
Capítulo 1. Revisión bibliográfica	9
1. Compuestos bioactivos-----	11
1.1. Compuestos fenólicos-----	11
1.1.1. Compuestos no flavonoideos-----	13
1.1.1.1. Ácidos-----	13
1.1.1.2. Estilbenos-----	14
1.1.2. Compuestos flavonoideos-----	15
1.1.2.1. Flavonoles-----	17
1.1.2.2. Flavonas-----	18
1.1.2.3. Flavanonas-----	19
1.1.2.4. Compuestos derivados del flavan-3-ol-----	19
1.1.2.5. Flavan-3,4-dioles-----	21
1.1.2.6. Taninos-----	21
1.1.2.7. Antocianos-----	26
1.2. Compuestos no fenólicos-----	27
1.2.1. Vitamina C-----	27
2. Reactividad de los compuestos bioactivos-----	29
2.1. Reactividad de los antocianos-----	29
2.1.1. Equilibrios de los antocianos en función del pH-----	29
2.1.2. Reacciones de copigmentación-----	30
2.1.3. Reacciones de degradación de los antocianos-----	32
2.1.3.1. Degradación térmica de los antocianos-----	33
2.1.3.2. Degradación de antocianos en presencia de cetonas----	34
2.1.3.3. Degradación oxidativa de antocianos-----	34
2.1.3.4. Degradación de antocianinas por el ácido ascórbico y oxígeno--	34
2.1.4. Formación de aductos por cicloadición: Piranoantocianos-	35
2.1.5. Reacciones de condensación de antocianos y taninos-----	36
2.1.5.1. Reacción directa tanino-antociano (T-A)-----	36
2.1.5.2. Reacción directa antociano-tanino (A-T)-----	37
2.1.5.3. Reacción indirecta a través de un puente metilmetileno-----	38
2.1.6. Reacciones de formación de dímeros de antocianos-----	39
2.2. Reacciones de oxidación de compuestos fenólicos-----	40
2.2.1. Reacciones de oxidación enzimática-----	40

2.2.2. Reacciones de oxidación no enzimática-----	41
2.2.3. Reacción de Maillard-----	42
2.2.3.1. Primera etapa de la reacción de Maillard-----	43
2.2.3.2. Reacciones de Maillard avanzadas: formación de dicarbonilos-----	44
2.2.3.3. Reacciones finales de Maillard: formación de compuestos finales-----	45
3. Fermentación alcohólica-----	47
3.1. Descripción del ciclo fermentativo-----	47
3.2. Proceso de fermentación-----	48
3.3. Otras reacciones-----	51
3.4. Factores determinantes del ciclo fermentativo y de las bebidas finales--	53
4. El arándano-----	57
4.1. Situación actual del arándano en España-----	57
4.2. Tipos de arándanos-----	58
5. Vinos de frutas-----	60
Capítulo 2. Métodos experimentales	63
1. Determinaciones generales-----	65
Redondez-----	65
Grado Brix-----	65
pH-----	65
Acidez volátil-----	65
Azúcares reductores-----	65
Etanol-----	66
2. Determinaciones espectrofotométricas-----	66
Color-----	66
Intensidad colorante y tonalidad-----	66
Color de pigmentos poliméricos-----	66
Compuestos fenólicos totales-----	66
Taninos totales-----	67
Actividad antioxidante-----	67
3. Determinación de compuestos bioactivos-----	68
Extracción en fase sólida de antocianos y flavonoles-----	68
Identificación y análisis de antocianos y flavonoles por HPLC----	69
Identificación y análisis de derivados de flavan-3-ol y <i>t</i> - resveratrol-----	71
Cuantificación de compuestos fenólicos-----	72
Vitamina C-----	73

4. Análisis sensorial-----	73
Prueba 1 y 2. Evaluación del aroma, sabor y color-----	74
Prueba 3. Prueba triangular-----	75
 Capítulo 3. Caracterización físico-química de variedades de arándanos cultivadas en el sur de España	 77
1. Introducción-----	79
2. Material experimental-----	83
3. Resultados y discusión-----	84
3.1. Parámetros físico-químicos-----	84
3.2. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante-----	85
3.2.1. Fruto entero-----	85
3.2.2. Piel y pulpa-----	98
4. Conclusiones/Conclusions-----	108
 Capítulo 4. Elaboración de bebidas de arándano	 109
1. Introducción-----	111
2. Material experimental-----	113
3. Resultados y discusión-----	115
3.1. Características de los zumos iniciales-----	115
3.2. Curvas de fermentación-----	120
3.3. Desarrollo de la fermentación e influencia del tipo de fermentación en la composición de los vinos-----	121
3.3.1. Parámetros generales-----	121
3.3.2. Compuestos bioactivos-----	124
3.3.3. Actividad antioxidante-----	136
3.3.4. Color-----	137
3.4. Influencia de la temperatura de fermentación en la composición de los vinos-----	139
3.4.1. Parámetros generales-----	140
3.4.2. Compuestos bioactivos-----	141
3.4.3. Actividad antioxidante-----	145
3.4.4. Color-----	145
3.5. Análisis estadístico-----	148
3.5.1. Estudio estadístico de relación de la actividad antioxidante con los compuestos bioactivos de los vinos obtenidos mediante fermentación parcial-----	149
3.5.2. Estudio estadístico de relación de la actividad antioxidante con los compuestos bioactivos de los vinos obtenidos mediante fermentación total-----	153

3.6. Efecto de los tratamientos postfermentativos en los vinos elaborados-----	156
3.6.1. pH y color-----	156
3.6.2. Compuestos bioactivos-----	161
3.6.3. Actividad antioxidante-----	166
3.7. Análisis sensorial-----	170
3.7.1. Evaluación del color, sabor y aroma-----	170
3.7.2. Prueba triangular-----	173
4. Conclusiones/Conclusions-----	174
 Capítulo 5. Estudio del envejecimiento de vinos de arándano en botella	 181
1. Introducción-----	183
2. Material experimental-----	185
3. Resultados y discusión-----	187
3.1. Evolución del pH-----	187
3.2. Evolución del color-----	188
3.3. Evolución de las antocianinas-----	192
3.4. Evolución de la actividad antioxidante-----	200
4. Conclusiones/Conclusions-----	202
 Chapter 6. Valorization of bilberry juice press waste	 203
1. Introduction-----	205
2. Experimental material-----	207
3. Results and discussion-----	210
3.1. Dry matter extraction yield-----	210
3.2. Total phenolic compounds-----	211
3.3. Anthocyanins-----	212
3.4. Flavonols-----	215
3.5. Color-----	216
3.6. Antioxidant activity-----	219
4. Conclusions-----	221
 Bibliografía	 223
Anexos	255

RESUMEN/ABSTRACT

Resumen

El presente trabajo, pretendía obtener vinos de arándanos como un nuevo producto procedente de este fruto en auge en nuestro país. El estudio se concreta en el seguimiento de los parámetros de color, composición fenólica medida por HPLC-DAD-MS, vitamina C y capacidad antioxidante durante las distintas etapas del proceso de elaboración. Para ello, en primer lugar, se han caracterizado cuatro variedades de arándano cultivadas en el sur de España (Moguer, Huelva), con el fin de elegir la variedad que presenta mejores características físico-químicas para la obtención de vino de arándano. La variedad Windsor fue elegida debido a su alto contenido en compuestos bioactivos y gran valor de actividad antioxidante. Una vez elegida la variedad, se procedió al proceso de vinificación a partir de arándanos. En este tipo de elaboración es necesaria la adición de azúcar al zumo debido a que este fruto no alcanza el grado alcohólico suficiente, por lo se utilizaron diferentes proporciones de fruto/disolución azucarada, además de diferentes temperaturas y tiempos de fermentación, con el objetivo de seleccionar las mejores condiciones para la elaboración de estos vinos. Asimismo, a los vinos elaborados, se les aplicaron una serie de tratamientos post-fermentativos para la mejora de sus características organolépticas, llevándose a cabo un estudio del efecto de estos tratamientos sobre los compuestos bioactivos, color y actividad antioxidante en los vinos de arándano finales. Posteriormente, se ha estudiado la evolución de estos vinos en botella durante un año, observándose grandes cambios en la composición de los mismos conforme el tiempo de envejecimiento aumenta. Por último, se realizó un estudio de la valorización de los residuos del proceso de obtención de zumos de arándano mediante el uso de una técnica verde, como es la extracción asistida con sonda de ultrasonidos.

Abstract

The aim of the present work, was obtain blueberry wines as a new product from this rising fruit in our country. The study is based on the determination of color parameters, phenolic composition measured by HPLC-DAD-MS, vitamin C and antioxidant capacity during the different stages of the winemaking process. For this, first of all, four blueberry varieties grown in southern Spain (Moguer, Huelva) have been characterized, in order to choose the variety that presents the best physico-chemical characteristics for the production of blueberry wines. The Windsor variety was chosen due to its high content of bioactive compounds and high value of antioxidant activity. The chosen variety was subjected to the winemaking process. In this type of elaboration the sugar addition to the juice is necessary because this fruit does not reach the sufficient alcoholic degree, so different proportions of fruit/sugar solution were used. In addition, different temperatures and times of fermentation were used, in order to select the best conditions for the production of these wines. Likewise, the elaborated wines were applied a series of post-fermentative treatments for the improvement of their organoleptic characteristics. A study of the treatments effect on bioactive compounds, color and antioxidant activity in the final blueberry wines were carried out. Subsequently, the evolution of these wines in bottle during a year has been studied. Several changes in the composition were observed in time. Finally, a study of the waste recovery from the process to obtain bilberry juices was carried out by using a green technique, such as assisted extraction with ultrasonic probe.

OBJETIVOS/OBJECTIVES

Objetivos

Los frutos rojos, como arándanos, moras, fresas o uvas tintas, son consumidos mundialmente en fresco, y también en forma de productos procesados, tales como zumos, confituras, frutas desecadas o helados, entre otros. El consumo de estas frutas está asociado con la protección frente al cáncer, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Una posible razón de esto, es que poseen vitaminas antioxidantes en su composición, como la E, C y pro vitamina β -caroteno. Sin embargo, los compuestos fenólicos poseen una capacidad antioxidante más potente que las propias vitaminas.

En los últimos años, las propiedades antioxidantes de estas frutas, y en concreto, las de los arándanos han despertado un creciente interés por parte de los científicos, fabricantes y consumidores, de modo que uno de los objetivos actuales de la industria alimentaria es la elaboración de alimentos funcionales con efectos específicos sobre la salud del consumidor.

La mayor parte de los compuestos bioactivos se encuentran en las pieles de los frutos rojos, por lo que sólo una parte minoritaria pasa al zumo mediante su procesado común. Por este motivo es por lo que se plantea procesar arándanos para obtener vinos enriquecidos al máximo en compuestos bioactivos.

Además, cuando una bebida se lanza al mercado, necesita ser estable en el tiempo, manteniendo sus características químicas y organolépticas, por lo que es necesario un estudio del efecto de los tratamientos postfermentativos y de la evolución del producto con el tiempo.

El presente trabajo de Tesis Doctoral se planteó en base a los siguientes objetivos:

1. Caracterizar desde el punto de vista físico y químico, el fruto del arándano estudiando por separado la piel, la pulpa y el fruto completo.
2. Estudiar la influencia de la variedad de arándanos en las características químicas de la baya.
3. Elaboración de nuevos vinos de arándano, mediante fermentación alcohólica y maceración con las partes sólidas del fruto. Se pretende la aceptación organoléptica (color, aroma y sabor) y que contengan el máximo de propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud humana.
4. Determinar tanto en el zumo como en el vino, la actividad antioxidante, contenido en compuestos fenólicos de interés, así como su contenido en vitamina C, azúcares, etc.
5. Estudio del efecto de los tratamientos postfermentativos en los vinos elaborados.
6. Estudio del color, compuestos fenólicos y actividad antioxidante durante el envejecimiento de los vinos en botella.
7. Valorización de residuos de zumos de arándano.

Objectives

The red fruits, such as blueberries, blackberries, strawberries or red grapes, are consumed worldwide in fresh, and also as processed products, such as juices, jams, dried fruits or ice cream, among others. The consumption of these fruits is associated with protection against cancer, cardiovascular and cerebrovascular diseases, due to they have antioxidant vitamins in their composition, such as E, C and β -carotene pro vitamin. However, phenolic compounds have a more potent antioxidant capacity than the vitamins.

In recent years, the interest of the antioxidant properties of these fruits, and in particular, of blueberry, has increased between scientists, manufacturers and consumers, so one of the current objectives of the food industry is the development of functional foods with specific effects on consumer health.

Most of the bioactive compounds are found in the red fruit skins, so only a minority part goes into the juice through their common processing. For this reason, the processed of blueberries is proposed to obtain enriched wines with the maximum in bioactive compounds.

In addition, a drink needs to be stable in time to remain in the market, maintaining its chemical and organoleptic characteristics, so a study of the effect of post-fermentation treatments and the evolution of the product over time is needed.

The objectives of this Doctoral Thesis were:

1. Physico-chemical characterization of blueberry, studying separately the skin, the pulp and the complete fruit.
2. Study the influence of the blueberry varieties on the chemical characteristics of the berry.
3. Elaboration of new blueberry wines, by alcoholic fermentation and maceration with the solid parts of the fruit, obtaining a product accepted by the consumer from the organoleptic point of view (color, aroma and flavor) and containing the maximum of beneficial antioxidant properties for human health.
4. Determine antioxidant activity, phenolic compounds concentration, as well as its content of vitamin C, sugars, etc. in the juice and wine.
5. Study of the effect of post-fermentation treatments on the wines produced.
6. Study of color, phenolic compounds and antioxidant activity during the wine aging in bottle.
7. Valorization of bilberry juice residues.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos o fitoquímicos se pueden definir como:

“Sustancias no nutritivas que intervienen en el metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos no se consideran esenciales para la salud humana, ya que no se requieren para el metabolismo, pero son indispensables a largo plazo para la misma. Dentro de estos compuestos se pueden encontrar sustancias como son los colorantes (pigmentos), aromáticas, reguladores del crecimiento, protectores naturales frente a parásitos entre otros.”

Dentro de estos compuestos bioactivos, se encuentran compuestos fenólicos y no fenólicos.

Los compuestos fenólicos, metabolitos secundarios de las plantas, están presentes de forma natural en las frutas y vegetales y son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las mismas (Szajdek et al., 2008). Son una familia de compuestos químicos presentes en el mundo vegetal bajo estructuras muy diversas y que en enología tienen un papel muy importante debido a que son los responsables del color y de características sensoriales, como astringencia, amargor y cuerpo (García-Puente Rivas et al., 2006; Arozarena et al., 2012). Dentro de los compuestos bioactivos que se pueden encontrar en las frutas, se tienen, los ácidos fenólicos, flavonoles, antocianos, taninos, compuestos derivados de flavan-3-ol, estilbenos, flavonas, flavononas, entre otros.

Por otro lado, existen compuestos no fenólicos bioactivos como pueden ser algunas vitaminas y algunos carotenos. En este caso, los arándanos son conocidos por su contenido en vitamina C que es un componente importante para la salud humana (López et al., 2010).

1.1. Compuestos fenólicos

Es bien conocido que los “berries” son ricos en compuestos fenólicos, como ácidos, taninos, estilbenos, antocianinas y otros flavonoides; pero sobre todo estos frutos han sido foco de investigación debido a su riqueza en antocianinas (Rios de Souza et al., 2014; Santos et al., 2016). Como se ha comentado anteriormente, los “blueberries” o arándanos azules son considerados como una de las mejores fuentes de antioxidantes debido a la elevada actividad antioxidante que presentan frente a los radicales libres y especies reactivas (Prior et al., 1998; Vrhovsek et al., 2012; Reque et al., 2014; Mikulic-Petkovsek et al., 2012), incluso algunos autores han llegado a afirmar que de todos los “berries”, los arándanos azules son los que mayor actividad antioxidante presentan, lo que está relacionado con su contenido en antocianinas (Kalt et al., 1999; Pereira Kechinski et al., 2010).

Debido a esto, este fruto previene de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes y cáncer (Routray and Orsat, 2011), desempeñan un papel importante en la mejora de la actividad del cerebro, actúa contra patógenos y previene de infecciones urinarias (Yan et al., 2012; Zafra-Stone et al., 2007; Li et al., 2018). Por todo ello, cada vez son más los estudios que se llevan a cabo en busca de nuevos productos a partir de arándanos, como es la obtención de vinos

de frutas (Martin-Gomez et al., 2017; Martin et al., 2005; Su and Silva, 2006, Sun and Chien, 2007; Vasantha Rupasinghe and Clegg, 2007; Yan et al., 2012; Behrends et al., 2017).

Los polifenoles comprenden una amplia variedad de compuestos, divididos en varias clases, como son ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonoles, flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, estilbenos y lignanos (Nile et al., 2014).

Entre los compuestos fenólicos de los “*berries*”, también se encuentran los taninos. Estos compuestos bioactivos son los responsables de la astringencia de muchos productos. La astringencia es un proceso complejo que implica muchos mecanismos, pero se considera que es una sensación táctil causada por una pérdida de lubricidad en la cavidad bucal (Kallithraka et al., 2001; Rossetti et al., 2009). Hoy en día, el mecanismo exacto por el que se produce la astringencia no se conoce bien, pero hay autores que afirman que este proceso se da por un aumento en la fricción, interacción entre taninos y proteínas orales o bien con los receptores del gusto, o por cambio de viscosidad en la saliva (De Wijk and Prinz, 2005; Rossetti et al., 2009; Payne et al., 2009; Brossaud et al., 2001; Kallithraka et al., 2001; Smith et al., 1996). Por tanto, estos compuestos han sido objeto de estudio de algunos autores (Lea, 1990; Peleg et al., 1999, Brossaud et al., 2001).

Los compuestos fenólicos citados anteriormente, difieren en su estructura y en su peso molecular (Puupponen-Pimia et al., 2005; Cieslik et al., 2006) y en la concentración de los mismos en los “*berries*” y los productos obtenidos a partir de ellos, está determinado por muchos factores como son la especie, la variedad, el cultivo, región, condiciones meteorológicas, maduración, tiempo de cosecha, el tiempo, las condiciones de almacenamiento (Szajdek et al., 2008;) y las condiciones de procesado de los mismos (Connor et al., 2002).

Los arándanos “*highbush*” o de arbusto alto, “*lowbush*” o de arbusto bajo y los de la variedad “*rabbiteye*” presentan los compuestos fenólicos principalmente en la piel (Su and Silva; 2006). Es a causa de esto, que durante el procesado de los arándanos se puede degradar o modificar la concentración de los compuestos fenólicos presentes en el fruto inicialmente, o incluso estos compuestos se pueden ver involucrados en diferentes reacciones secundarias en las que se modifique su estructura química. A partir de los procesados convencionales, sólo una pequeña parte de los compuestos fenólicos queda presente en el producto final con lo que una elección o una mejora del proceso de elaboración darán lugar a productos con valor añadido (Su and Silva; 2006). Por ejemplo, durante el proceso de vinificación, los compuestos fenólicos y/o bioactivos se extraen hacia el vino, pero su concentración final se puede ver modificada por el método de obtención del vino usado, las condiciones de fermentación, envejecimiento, entre otras (Soto Vazquez et al., 2010; Ivanova et al., 2011).

Existen muchísimos compuestos fenólicos en la naturaleza. De todos ellos, se conoce que unos 8000 presentan una estructura común. Esta estructura es un anillo bencénico en la que se puede encontrar al menos un sustituyente hidroxilo.

Debido a la cantidad de compuestos fenólicos que existen, estos compuestos se suelen clasificar en compuestos no flavonoideos y flavonoideos (Oliveira et al., 2011), atendiendo a su estructura química.

1.1.1. Compuestos no flavonoideos

En los alimentos, los compuestos fenólicos no flavonoideos más importantes son los ácidos fenólicos, dentro de los que se encuentran los ácidos hidroxibenzoicos, los ácidos hidroxicinámicos; y los estilbenos.

1.1.1.1. Ácidos

Los arándanos son ricos en ácidos fenólicos, en particular, los ésteres, glucósidos, y amidas de ácidos hidroxicinámicos y hidroxibenzoicos se han identificado en estos frutos (Skrede et al., 2000), más predominantemente ácido clorogénico, cuya estructura se muestra en la Figura 1.1 (Zheng et al., 2003, Rodriguez-Mateos et al., 2012, Costa et al., 2018). Ferguson et al. (2018) determinaron ácido clorogénico en arándanos maduros e inmaduros y vieron que en estos últimos, la concentración de este ácido era 1900 mg/100 materia seca frente a 490 mg/100 g materia seca en arándanos maduros. Además de estos ácidos los autores identificaron el ácido neoclorogénico y el criptoclorogénico.

Los ácidos oxálico, glucónico, málico, cítrico (Fu et al., 2015), el ácido quínico (no fenólico) (Gao et al., 2015), el *p*-cumárico y el caféico (Zheng et al., 2003) han sido identificados en arándanos y otros “*berries*”. La combinación del ácido caféico encontrado en “*berries*” (Zheng et al., 2003) con el ácido quínico se conoce como ácido clorogénico o 3-cafeato del ácido quínico.

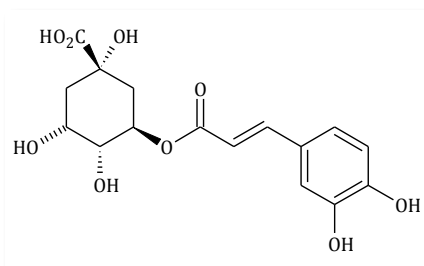


Figura 1.1. Estructura del ácido clorogénico.

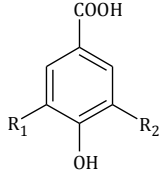
Sellappan et al. (2002) estudiaron la composición de ácidos fenólicos en arándanos encontrando concentraciones entre 0.75 to 29.28 mg/100 g fruta fresca en arándanos “*southern highbush*”. Dentro de los ácidos fenólicos más encontrados en alimentos, los ácidos hidroxibenzoicos y los hidroxicinámicos, son los más importantes.

Ácidos hidroxibenzoicos

Los ácidos hidroxibenzoicos son moléculas de siete átomos de carbono con una estructura C6-C1. Esta estructura se compone de un anillo bencénico sobre el que se unen diferentes sustituyentes (Tabla 1.1). Algunos de los ácidos que se han identificado y cuantificado en frutas y bebidas, son el ácido vanílico, *p*-hidroxibenzoico, protocatequico o sirínico y el ácido gálico. Este último se encuentra en altas concentraciones en vinos tintos de uva (65-165 mg/L)

(Cheynier et al., 1998) y el ácido vanílico ha sido cuantificado en algunos “berries” (Zheng et al., 2003).

Tabla 1.1. Estructura de los ácidos hidroxibenzoicos.

	Ácido hidroxibenzoico	R ₁	R ₂
	Ácido gálico	OH	OH
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H
	Ácido protocatéquico	OH	H
	Ácido vanílico	OCH ₃	H
	Ácido siríngico	OCH ₃	OCH ₃

Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos poseen una estructura química basada en un anillo bencénico con una cadena alifática de 3 carbonos y de uno a varios grupos hidroxilos (Figura 1.2). Estos ácidos también se caracterizan por un doble enlace en la cadena alifática, lo cual le confiere la característica de poder encontrarse en formas de isómeros *cis* o *trans*, siendo esta última la forma más abundante de estos compuestos. (Rodríguez Montealegre et al., 2006; Garrido and Borges, 2011).

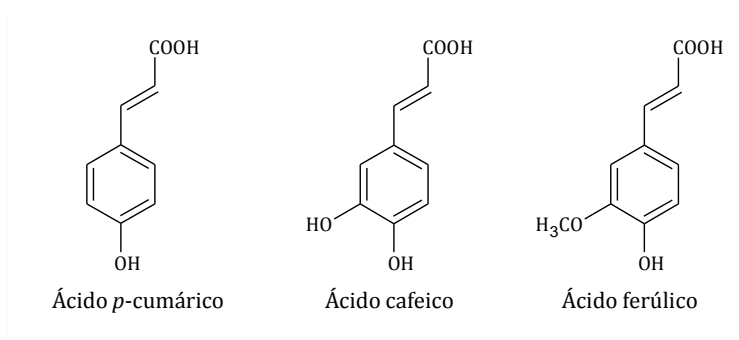


Figura 1.2. Principales ácidos hidroxicinámicos.

Los ácidos hidroxicinámicos más importantes son los ácidos cafeico, *p*-cumárico y ferúlico y han sido identificados por algunos autores en arándanos azules (Costa et al., 2018). Estos ácidos se pueden encontrar en forma de ésteres del ácido tartárico, dando lugar a los ácidos caftárico (ácido cafeoil tartárico), cutárico (ácido *p*-cumaril tartárico) y fertárico (ácido feruloiltartárico).

1.1.1.2. Estilbenos

Este tipo de compuestos son producidos por las plantas como respuesta de ataques fúngicos, bacterianos o víricos (Langkake and Pryce, 1976). Los estilbenos presentan una estructura química que corresponde a la fórmula C6-C2-C6, con dos anillos bencénicos unidos por un puente etileno (Figura 1.3).

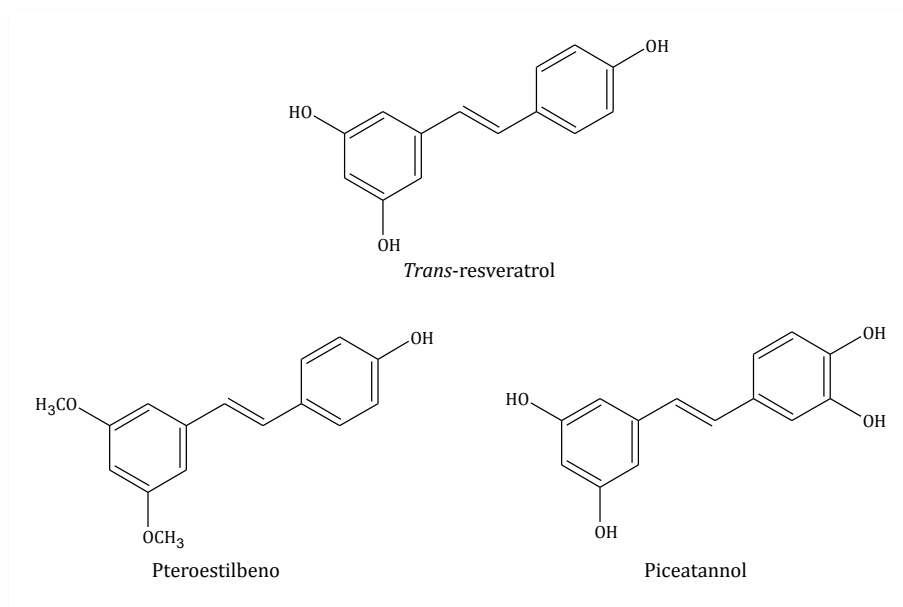


Figura 1.3. Estructuras químicas del resveratrol, pterostilbeno y el piceatanol.

Los estudios sobre este tipo de compuestos han aumentado considerablemente en los últimos años, tras demostrarse sus propiedades antioxidantes y acción anticarcinogénica (Jang and Pezzuto, 1999; Scott et al., 2012; Hung et al., 2017, Li et al., 2017). Muchos “*berries*” y en concreto los arándanos, contienen estilbenos, como es el resveratrol (Lyons et al., 2003; Rimando et al., 2004). De este grupo de compuestos, también se han encontrado en arándanos y uvas, el pterostilbeno y el piceatanol (Figura 1.3), que son dos compuestos de los que se ha demostrado que presentan propiedades beneficiosas para la salud humana (Rimando et al., 2004).

1.1.2. Compuestos flavonoideos

Los flavonoides son un tipo de compuestos que presentan funciones muy diferentes tanto en plantas como en metabolitos secundarios, ya que están implicados en mecanismos de defensa de las plantas, mecanismos de pigmentación y de resistencia frente a patógenos (Cotoras et al., 2001; Prasad et al., 2009; Wang et al., 2009; Zheng et al., 2003).

Estos compuestos presentan una estructura de 15 átomos de carbono de esqueleto base, donde la estructura base es C₆-C₃-C₆ formada por dos anillos aromáticos (A y B) que se encuentran unidos por un puente de tres átomos de carbono que forman otro anillo (C) (Figura 1.4). El anillo A se encuentra normalmente dihidroxilado en la posición 5 y 7, mientras que el anillo B puede estar mono, di o trihidroxilado y presentar diferentes grados de metoxilación. Estos compuestos se diferencian unos de otros, por el grado de insaturación y los sustituyentes del anillo C (Cieslik et al., 2006; Rivas Gonzalo et al., 2002). De esta forma se obtienen diferentes compuestos, como los flavonoles que presentan un ciclo pirona; los flavanoles monómeros y polímeros o taninos, que poseen un ciclo

pirano saturado y las antocianidinas, que tienen el anillo C en forma pirilio con una carga catiónica (catión flavilio) (Figura 1.5).

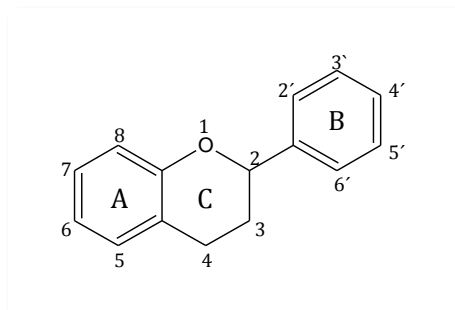


Figura 1.4. Esqueleto base de los compuestos flavonoides.

Debido a su naturaleza orgánica, la solubilidad de estos compuestos depende de las sustituciones en los anillos, ya que cuanto más hidroxilaciones y glicosilaciones, más hidrófilos son. Sin embargo, los compuestos flavonoides serán más lipófilos, cuando posean más sustituciones por metoxilación.

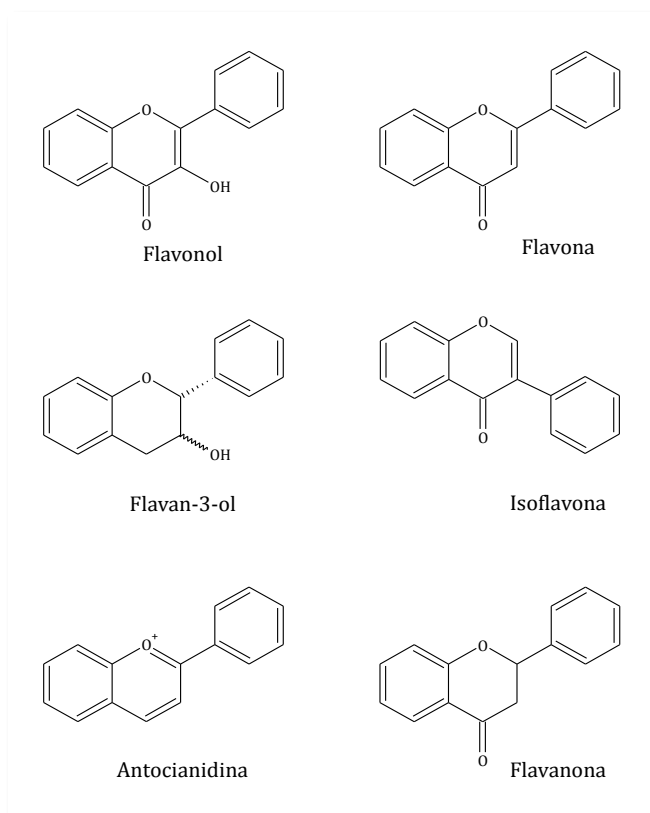


Figura 1.5. Estructura base de los principales flavonoides.

1.1.2.1. Flavonoles

La estructura química de los flavonoles presenta un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, y un grupo hidroxilo en este último carbono (Figura 1.6). Pueden denominarse 3,5,7-trihidroxiflavonas ya que la mayoría de ellos se encuentran hidroxilados en las posiciones 3, 5 y 7 (Castillo-Muñoz et al., 2007). Dentro de esta familia fenólica se encuentran las agliconas quercetina, kaempferol, isorhamnetina, miricetina, laricitrina y siringerina, que se presentan normalmente unidas a moléculas de azúcar resultando derivados glucósidos, glucurónidos, galactósidos y diglucósidos. Las agliconas se han podido identificar en vinos y no en uvas, debido a la hidrólisis ácida de los glicósidos durante los procesos de vinificación y envejecimiento (Zou et al., 2002; Zafrilla et al., 2003; Castillo-Muñoz et al., 2009).

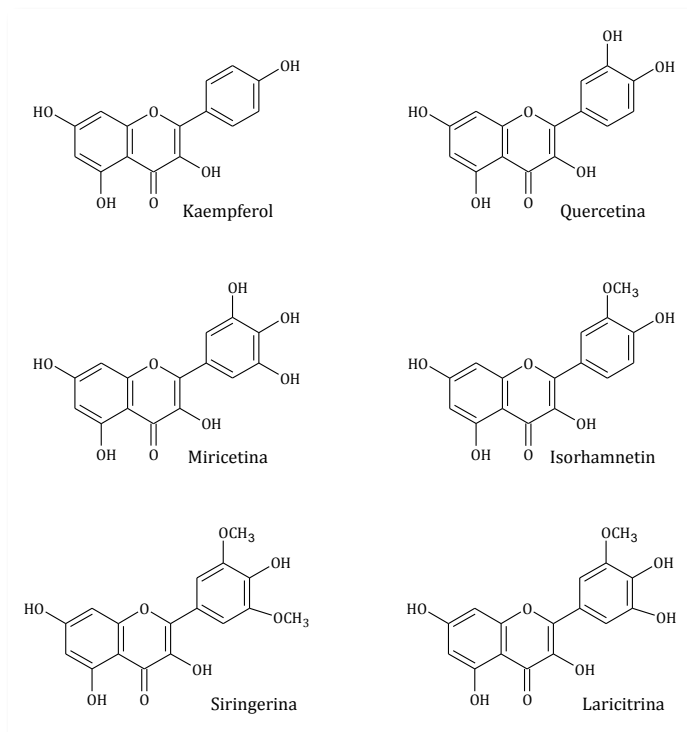


Figura 1.6. Estructura de los principales flavonoles.

Los “*berries*” son conocidos por su contenido en flavonoles como quercetina, miricetina, kaempferol, así como sus derivados glucósilados (Mikulic-Petkovsek et al., 2012). En los “*berries*”, estos compuestos han sido objeto de estudio de muchos autores debido a su contribución a la actividad antioxidante (Zheng et al., 2003; Ciric et al., 2018). En arándanos se han determinado compuestos como el quercetín-3-*O*-galactósido, quercetín-3-*O*-glucósido, quercetín-3-*O*-rutinósido, miricetín-3-*O*-glucósido, miricetín-3-*O*-ramnósido (Skrovankova et al., 2015; Fergusson et al., 2018), laricitín-3-*O*-glucósido, kaempferol-3-*O*-glucósido (Vrhosek et al., 2012). Los flavonoles mayoritarios encontrados en los arándanos son los derivados de la quercetina (Vrhosek et al., 2012). La concentración de estos compuestos en los arándanos oscila entre 24-28.5 mg/ kg fruta fresca,

llevando a cabo la cuantificación con HPLC (Häkkinen et al., 1999; Bilyk and Sapers; 1986).

Estos compuestos son pigmentos de color amarillo que se encuentran en las pieles de los frutos y, son responsables del color de los vinos blancos y tintos de uva. Este hecho es debido al máximo de absorbancia que presentan a longitudes de onda de aproximadamente 350 nm y 370 nm, en el caso de los glicósidos y agliconas respectivamente. Además, pueden incrementar el color de los vinos tintos, ya que son buenos copigmentos de los antocianos (Hilbert et al., 2015; Boulton, 2001). Autores como Santos et al. (2016) midieron el contenido total de flavonoles en vinos de arándano, encontrando concentraciones elevadas de estos compuestos (1200-2500 mg quercetin-3-rutinósido/L).

1.1.2.2. Flavonas

Las flavonas presentan un doble enlace entre los carbonos 2 y 3. Además se caracterizan por la ausencia de un -OH en posición 3 (Figura 1.7). En general, estos compuestos se encuentran en numerosas frutas y presentan propiedades beneficiosas para la salud humana (Bustamante-Rangel et al., 2018). La luteolina, la apigenina y la tricina son las agliconas principales encontradas en vegetales. El glucósido de la luteolina ha sido identificado en arándanos maduros e inmaduros, aunque en mayor concentración en arándanos maduros (Ferguson et al., 2018). Estos compuestos pueden dar lugar a isómeros como son las isoflavonas, que presentan el anillo B en la posición 3. Macheix et al. (1991) encontraron la flavonona luteolina en uvas. Además, Zoecklein et al. (1995) identificaron la isoflavona genisteína, en uvas y vinos.

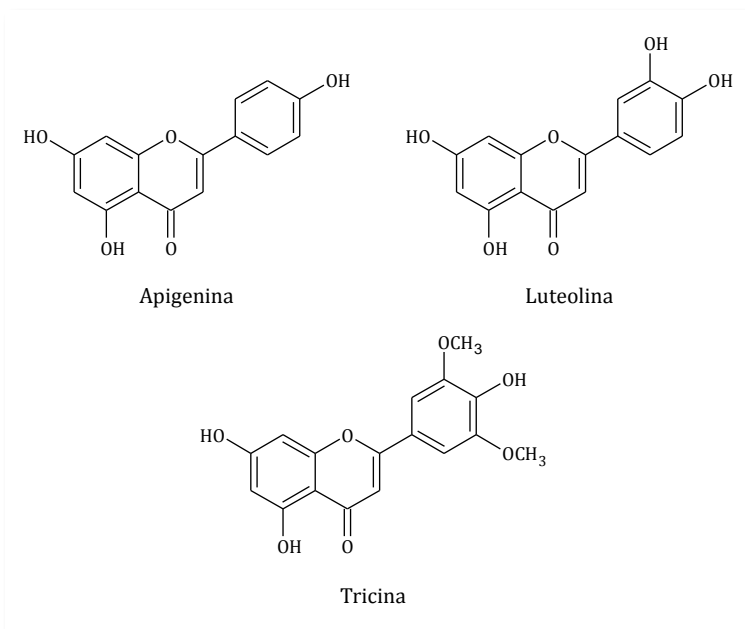


Figura 1.7. Estructura base de las flavanonas.

1.1.2.3. Flavanonas

Las flavanonas o dihidroflavonas, provienen de los primeros pasos de la síntesis de compuestos flavonoideos. Su estructura deriva de la reducción de los compuestos anteriores, presentando un centro quiral en el C2. En la naturaleza, normalmente, se encuentran con una configuración α del C2 entre el anillo B y C. De las flavononas, las más conocidas son las naringenina (Figura 1.8) y el eriodictiol, que son las formas reducidas de la apigenina y luteolina respectivamente. Estos compuestos no son muy comunes en frutos aunque Ferguson et al. (2018) identificaron naringenina en arándanos maduros, aunque en baja concentración (0.023 mg/100 g materia seca).

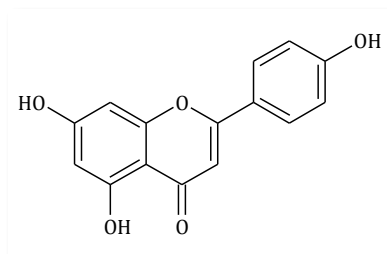


Figura 1.8. Estructura de la naringenina.

1.1.2.4. Compuestos derivados de flavan-3-ol

Los derivados del flavan-3-ol, flavan-3-oles o flavanoles presentan en su estructura un anillo pirano como heterociclo central, una cadena carbonada entre C2 y C3, un grupo hidroxilo en posición 3 y ausencia de grupo carbonilo en posición 4.

Según sea el grado de hidroxilación del anillo B (1, 2 ó 3 grupos hidroxilos, nunca metoxilados) se obtendrán diferentes derivados de flavan-3-oles. Los compuestos que se encuentran más fácilmente en las frutas son los pares de estereoisómeros catequina y epicatequina, y galocatequina y epigalocatequina (Su and Singleton, 1969) (Figura 1.9).

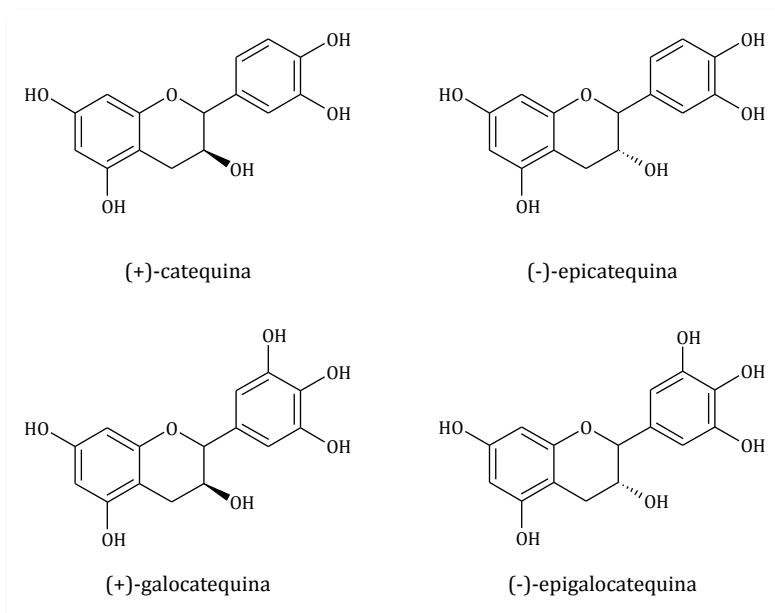


Figura 1.9. Estructura base de derivados de flavan-3-oles.

La catequina y epicatequina están ortohidroxiladas en posición 3' y 4' del anillo B respectivamente, mientras que la galocatequina y la epigallocatequina poseen un grupo hidroxilo más sobre el carbono 5' (Figura 1.9). En estas estructuras químicas, los carbonos C2 y C3 son asimétricos por lo que cada compuesto presenta dos isómeros ópticos, (+) y (-), aunque los derivados más extendidos son la (+)-catequina y la (-)-epicatequina. El heterociclo presenta una peculiaridad ya que no es plano. Este heterociclo presenta una estructura espacial tipo semisilla, donde el oxígeno piránico y el carbono 4 están en el mismo plano y así el carbono 2 se puede colocar por encima o por debajo de dicho plano, haciendo que estos compuestos puedan presentar también isomería *cis-trans*. La (-)-epicatequina y (-)-epigallocatequina pueden además esterificarse con el ácido gálico, resultando (-)-epicatequín-3-*O*-galato y (-)-epigallocatequín-3-*O*-galato (Su and Singleton, 1969).

En arándanos, García-Alonso et al. (2004), determinaron el contenido de flavanoles de bajo grado de polimerización (monómeros + dímeros + trímeros). Estos autores midieron las concentraciones de flavan-3-oles en 28 frutas, indicando que normalmente los monómeros epicatequina y catequina fueron los predominantes en los "*berries*". Para el caso concreto de los arándanos, con una concentración total de flavan-3-oles de 44.46 mg/100 g materia seca, manifestaron que los dímeros y trímeros fueron los compuestos que predominaron. Gavrilova et al. (2011), midieron dos compuestos, catequina y el dímero B2, en tres de las variedades estudiadas, siendo sus concentraciones muy inferiores a las de otras familias fenólicas. Pascual-Teresa (2000), determinaron en arándanos, galocatequina, catequina, dímero B1, epicatequín-3-*O*-galato, dímero B2, epicatequina. Ferguson et al. (2018) identificaron en arándanos azules catequina, epicatequina, galocatequina y epigallocatequina. En semillas, raspones y hollejo de uvas del género *Vitis vinífera*, también se han identificado este tipo de compuestos en altas concentraciones (Escribano-Bailón et al., 1995; Jordão et al.,

2001a; Mateus et al., 2001; Jordão et al., 2001b) y en vinos (De Freitas et al., 2000; Monagas et al., 2003a).

1.1.2.5. Flavan-3-4-dioles

Estos compuestos se diferencian de los compuestos anteriores en que presentan un hidroxilo adicional en la posición 4 del heterociclo oxigenado (Figura 1.10). Su nombre proviene de la antocianina que se forma cuando son sometidos a calentamiento en medio ácido, siendo parte de su nombre correspondiente a dicha antocianina. Algunos autores piensan que estos compuestos están indirectamente relacionados con la producción de proantocianidinas (Zoecklein et al., 1995; Koponen et al., 2007).

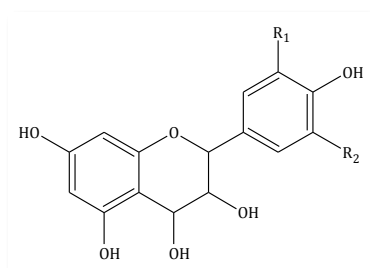


Figura 1.10. Estructura base de los flavan-3,4-dioles.

1.1.2.6. Taninos

Los taninos son compuestos de alto peso molecular que dan lugar a multitud de estructuras químicas y presentan numerosos efectos beneficiosos para la salud, debido a su efecto antioxidante en el organismo (Kallio et al., 2014). En condiciones normales, los taninos representan entre un 2 y un 7% del total de la planta (Vazquez-Flores et al., 2012). Estos compuestos son un componente importante en los “berries”. Algunos autores han determinado la concentración de taninos totales en vinos de arándano (Behrends et al., 2017) y vinos de arándano seco (Martin-Gomez et al., 2017). Estos compuestos participan del sabor y el color de muchos frutos y sus productos tras el procesamiento de los mismos (Szajdek et al., 2008) ya que se caracterizan por ser capaces de establecer combinaciones estables con las proteínas (Bate-Smith and Swain, 1965), y pueden combinarse con polisacáridos (Riou et al., 2002), alcaloides y gelatina (Bate-Smith and Swain, 1965), siendo responsables de fenómenos como la astringencia (Cerpa-Calderón et al., 2008) o el encolado en la clarificación de vinos. Según la naturaleza de las moléculas de partida, se pueden distinguir entre taninos condensados, taninos hidrolizables y taninos complejos o mixtos.

Taninos condensados

Los taninos condensados son metabolitos secundarios producidos por las plantas y son constituyentes comunes en “berries” acumulando entre un 150-420 mg/100 g de fruta fresca, en diferentes tipos de arándanos y fresas (Ferguson et al., 2018). Estos compuestos junto con las antocianinas han sido ampliamente estudiados por los beneficios que presentan para la salud humana.

Las proantocianidinas, también conocidas como taninos condensados o taninos catéquicos, son compuestos oligoméricos o poliméricos formados por unidades de flavan-3-ol (Kallio et al., 2014). Si estos compuestos se calientan en medio ácido dan lugar a antocianos, de ahí que se los conozca también como proantocianidinas.

Debido a la multitud de estructuras que pueden resultar, la identificación de estos compuestos se hace compleja. Kallio et al. (2014) lograron identificar más de 60 combinaciones de epicatequina y epigallocatequina usando cromatografía de líquidos en fase normal, reversa e interacción hidrofílica. Naczki and Shahidi (2004) determinaron taninos por el denominado método de la vainillina, en el que se lleva a cabo una reacción de un aldehído aromático, la vainillina, con el anillo A de los flavan-3-ol originando un aducto de color rojo. Aunque la forma más sencilla para determinar estos compuestos es sometiéndolos a hidrólisis ácida y determinar los antocianos resultantes por HPLC como lo han hecho autores como Vazquez-Flores et al. (2012) o por espectrofotometría, cuantificando el total, como lo llevaron a cabo Martin-Gomez et al. (2017).

De forma general, se pueden diferenciar dos grupos de taninos condensados, dependiendo de la antocianidina que se libere tras la hidrólisis ácida:

- *Prodelfinidinas*: compuestas por (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina.
- *Procianidinas*: compuestas por (+)-catequina, (-)-epicatequina y que son las proantocianidinas más abundantes. Dentro de este tipo, los más importantes, son los dímeros tipo B ($C_{30}H_{26}O_{12}$) y tipo A ($C_{30}H_{24}O_{12}$). Los primeros son los más estudiados y se conocen dos clases: proantocianidinas de la serie B1 a B4, que son las más abundantes y están formadas de monómeros de (+)-catequina y (-)-epicatequina mediante enlaces C4-C8 (Figura 1.11).

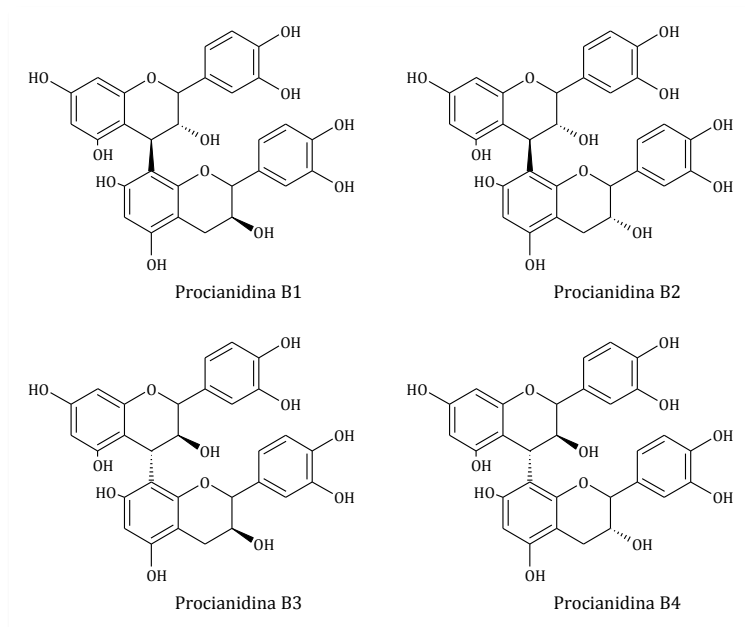


Figura 1.11. Estructuras químicas de las procianidinas de la serie B1 a B4.

Por otro lado las procianidinas de la serie B5 a B8 son menos abundantes y se forman mediante la unión de unidades monómeras por enlaces C4-C6 (Figura

1.12). Pascual-Teresa (2000) y Gavrilova et al. (2011) determinaron algunos de estos dímeros en arándanos.

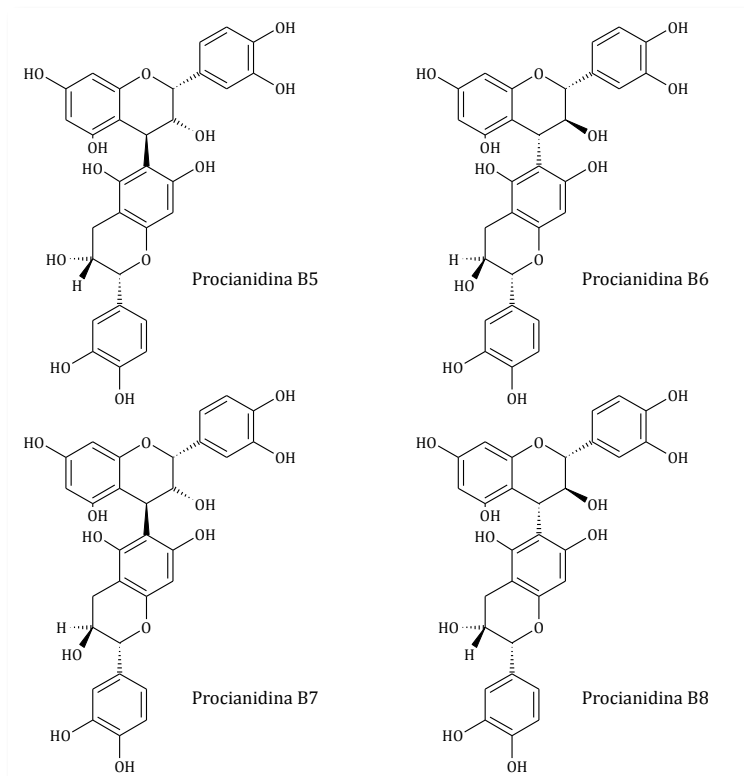


Figura 1.12. Estructuras químicas de las procianidinas de la serie B5 a B8.

Las proantocianidinas tipo A (Figura 1.13), son dímeros ($C_{30}H_{24}O_{12}$) que poseen, además del enlace interflavano C4-C8 o C4-C6, un enlace éter entre los carbonos C5 o C7 de la unidad terminal y el carbono C2 de la unidad superior. Ferguson et al. (2018), identificaron proantocianidinas B1, B2 y B4 en arándanos, pero no llegaron a identificar el dímero B3 ni la proantocianidina A2.

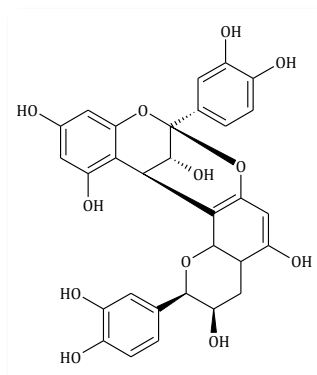


Figura 1.13. Estructura química de la proantocianidina A2.

Existen también las procianidinas tipo C y D, que son trímeros formados por la unión con (+)-catequina y (-)-epicatequina donde las uniones interflavano corresponden al tipo B, en el primer caso; y trímeros en los cuales una unión interflavano es del tipo B y otra del tipo A, en el segundo caso.

Se pueden encontrar también derivados esterificados como son epicatequín-3-*O*-galato, los dímeros B2-3-*O*-galato, B2-3,3'-di-*O*-galato, B1-3-*O*-galato, etc., resultantes de la reacción de monómeros, dímeros y oligómeros de flavan-3-ol esterificados con ácido gálico, mediante la unión por el carbono 3 en monómeros o si se trata de derivados dímeros u oligómeros por el C3 o C3'.

En el caso de compuestos más polimerizados, como son las procianidinas condensadas, están formadas por más de 10 unidades derivadas del flavan-3-ol y presentan una masa molecular superior a 3000 Da (Figura 1.14). En estos compuestos la actividad antioxidante aumenta, debido a la proximidad del gran número de anillos aromáticos y grupos hidroxilos que los componen (Hagerman et al., 1998).

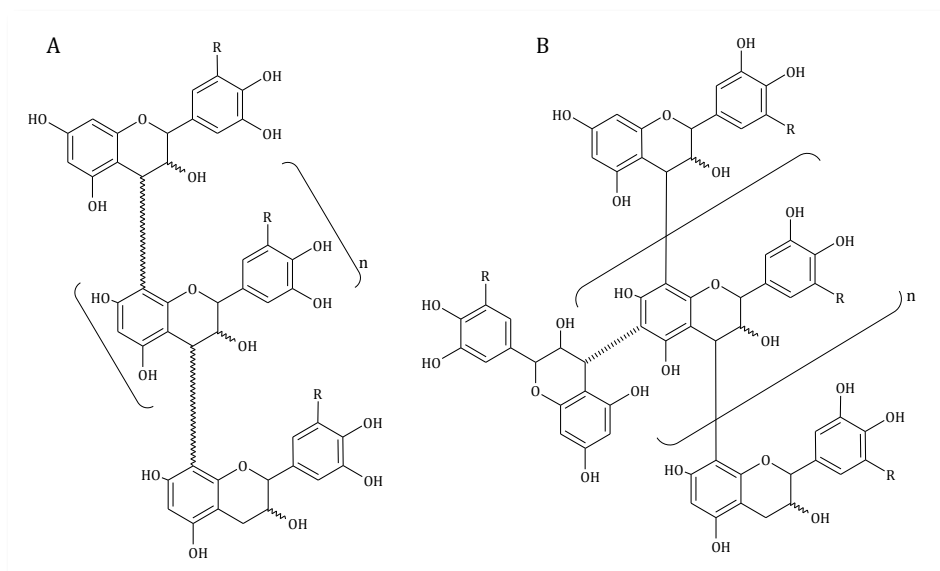


Figura 1.14. Estructura química de las procianidinas condensadas (A) y de las proantocianidinas (B).

Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables son ésteres del ácido gálico y del ácido elágico (Figura 1.15) con glucosa u otros azúcares (Oliveira et al., 2011) y son compuestos que dan lugar a ácidos fenólicos y a azúcares tras ser degradados por modificación de pH y/o por hidrólisis enzimática o no enzimática.

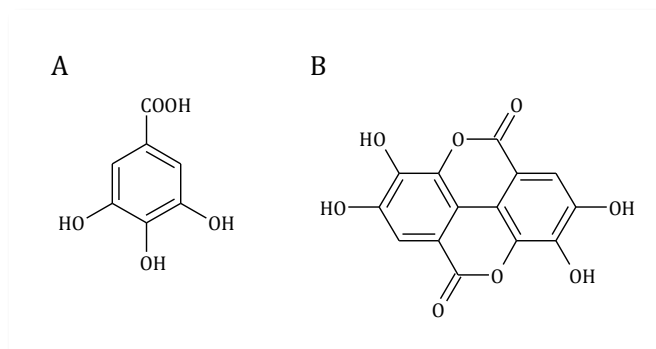


Figura 1.15. Estructura del ácido gálico (A) y ácido elágico (B).

Los taninos hidrolizables no son muy conocidos en la naturaleza, tal vez, por su menor abundancia en las plantas o por la complejidad para extraerlos. El más estudiado es pentagaloi-O-glucopiranososa (PGG), cuya estructura se muestra en la Figura 1.16, al que se le reconoce cierta actividad anticancerígena, antidiabética y antioxidante en modelos experimentales *in vitro* (Vazquez-Flores et al., 2012). La uva contiene tanto taninos condensados como hidrolizables, lo que se ha justificado por influencia genética (Schofield et al., 2001).

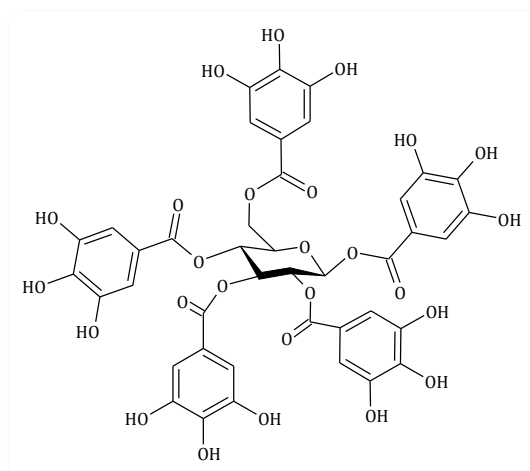


Figura 1.16. Estructura de pentagaloi-O-glucopiranososa.

Dentro de esta familia de compuestos se encuentran los galotaninos y elagitaninos, dependiendo de si liberan ácido gálico o ácido elágico tras su hidrólisis ácida.

Los elagitaninos se disuelven en medios hidroalcohólicos, lo que en el caso del envejecimiento en barrica de los vinos, hace que haya una gran extracción de estos compuestos hacia el medio. Estos compuestos contienen una o más unidades de ácido hexahidroxidifénico que se esterifica con un poliol, normalmente glucosa. Su hidrólisis, con ácidos o bases, resulta en ácido hexahidroxidifénico que por lactonización pasa a ácido elágico (Koponen et al., 2007).

Taninos complejos

Los taninos complejos o mixtos son resultado de la unión de los dos tipos de taninos comentados anteriormente. Esta unión se da por uniones covalentes entre elagitaninos y flavanoles. Son compuestos que se encuentran en pequeñas cantidades en vinos (Saucier et al., 2006).

1.1.2.7. Antocianos

Los antocianos (del griego *anthos*=flor y *kianos*=azul) son metabolitos secundarios de las plantas y son la subclase más importante de los flavonoides (He and Giusti, 2010). Estos compuestos son los pigmentos naturales responsables de los colores brillantes naranjas, rosa, rojo, violeta y azul en las flores y frutas de algunas plantas (Pereira Kechinski et al., 2010). Además, son antioxidantes naturales, con actividad antirradicálica y con efectos nutricionales y terapéuticos. Los antocianos o antocianinas son heterósidos polihidroxilados y/o metoxilados que derivan del ion flavilio o fenol-2-benzopirilio (Figura 1.17).

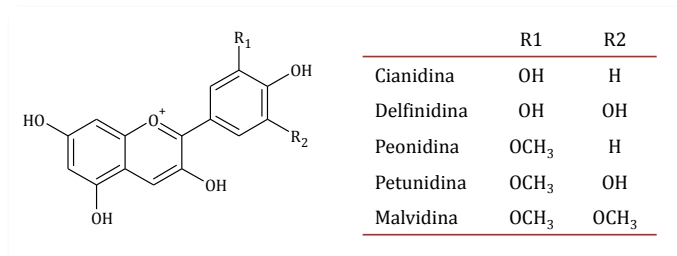


Figura 1.17. Estructura base de las antocianidinas.

Algunos autores han afirmado que los antocianos son unos de los compuestos más abundantes en los arándanos, los cuales están casi exclusivamente en forma glucosilada (Cho et al., 2004). Los antocianos son compuestos que se pueden encontrar en forma de aglicona a lo que se le denomina antocianidina o unidos a una o varias moléculas de azúcar denominándose antocianinas o antocianos (Reque et al., 2014). Entre los azúcares a los que pueden ir unidos las agliconas están la glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa, fructosa. Las agliconas (antocianidinas) no se encuentran de forma abundante en la naturaleza debido a la baja estabilidad que le confiere la deficiencia electrónica del ion flavilio. El ion flavilio o fenol-2-benzopirilio es en concreto un ion oxonio, en el cual el oxígeno es tetravalente. La estructura de este ion es un híbrido en resonancia, donde la carga positiva está deslocalizada, dando lugar por tanto a diferentes estructuras oxonio-carbonio. Para saldar esta deficiencia electrónica, las agliconas reaccionan con azúcares formando heterósidos que a su vez pueden estar esterificados con ácidos orgánicos.

Los antocianos son, en parte, los compuestos responsables de las características cromáticas de un vino. La evolución de estos compuestos dependerá de la concentración de antocianinas en la fruta, del método vinificación, y de múltiples reacciones químicas en las que se ven involucrados durante el proceso fermentativo y el envejecimiento. Las reacciones en las que se ven involucrados

estos compuestos dan lugar a pigmentos normalmente más estables que confieren tonos rojos a anaranjados (Alcalde-Eon et al., 2006).

En los arándanos se han determinado derivados de las antocianidinas delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (Routray and Orsat, 2011; Sanchez-Moreno et al., 2003). Además, en residuos de prensa de zumos de arándanos europeos, se han identificado derivados acetilglucósilados y acetilgalactósilados de algunas de estas agliconas (Varo et al., 2018). Muchos autores han demostrado que los “*blueberries*” son una de las fuentes dietéticas más ricas en antocianinas (Wu et al., 2018), encontrando algunos de ellos, 15 derivados diferentes (Nyman and Kumpulainen 2001; Nicoué et al., 2007; Hosseinian y Beta 2007; Müller et al., 2012; Koca et al., 2009) o incluso en residuos de zumos de arándano (*V. Myrtillus* L.) se han llegado a encontrar hasta 21 derivados de estos compuestos (Varo et al., 2018). Las antocianinas mayoritarias de los “*blueberries*” son el malvidín-3-*O*-galactósido y los derivados 3-*O*-galactósidos de la cianidina, petunidina, malvidina y delfinidina (Del Rio et al., 2010), siendo de estos, el malvidín-3-*O*-galactósido el principal antociano encontrado en numerosos estudios de variedades de arándanos (Wang et al., 2012, Skrede et al., 2000, Zheng et al., 2003, Müller et al., 2012, Varo et al., 2018), mientras que otros encontraron como antociano mayoritario el delfinidín-3-*O*-galactósido (Cho et al., 2004). Estos compuestos han sido determinados en zumos (Reque et al., 2014, Varo et al., 2018) y vinos de arándano (Müller et al., 2012; Martin-Gomez et al., 2017). Sanchez Moreno et al. (2003) compararon vinos de uva y vino de arándanos comerciales, viendo que el contenido total de antocianos en estos últimos oscilaba entre 14.7 y 162 mg cianidín-3-*O*-glucósido/L.

1.2. Compuestos no fenólicos

1.2.1. Vitamina C

La vitamina C se considera uno de los compuestos hidrosolubles más importantes de muchas frutas, aunque donde es más conocida es en cítricos. Este compuesto es un importante componente antioxidante y un excelente agente de reducción. Es una vitamina que se sintetiza a partir de glucosa, mediante una serie de reacciones catalizadas por enzimas.

El término vitamina C no solo se refiere al ácido ascórbico, sino que, también en él se incluyen todos los compuestos que exhiben la actividad biológica de ascorbato, como son la forma oxidada y ésteres. En condiciones oxidativas, el ácido ascórbico se convierte fácilmente en ácido dehidroascórbico a través de un intermedio de radicales libres en un proceso reversible (Figura 1.18) que, en parte, puede explicar el efecto antioxidante atribuido a esta vitamina (Nyyssonen et al., 2000).

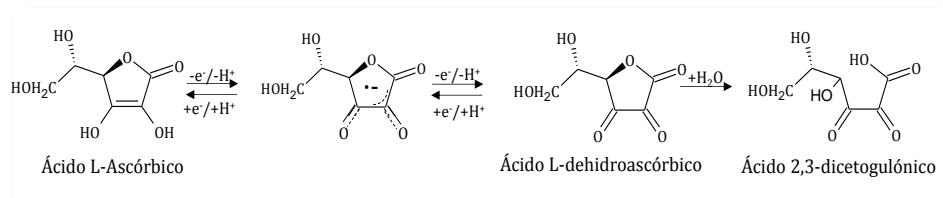


Figura 1.18. Forma reducida y oxidada de la vitamina C.

Los humanos no son capaces de sintetizar este compuesto ni su forma oxidada (ácido dehidroascórbico), pero ambos representan en la dieta un componente esencial, la vitamina C (Cocetta et al., 2012). Sdiri et al. (2012) midieron la vitamina C total y el ácido L-ascórbico en cítricos, obteniendo por diferencia de estos dos valores el contenido de ácido dehidroascórbico.

Se sabe que los arándanos contienen elevada concentración de vitamina C (Skrede et al., 2000; López et al., 2010). El estudio del contenido de vitamina C en frutas y zumos, ha sido estudiado por numerosos autores (Prior et al., 1999; Proteggente et al., 2002; Gardner et al., 2000; Odriozola-Serrano et al., 2007) y en vinos obtenidos a partir de arándanos secos (Martin-Gomez et al., 2017). Debido a los efectos beneficiosos para la salud humana que presenta la vitamina C, incluso es añadida a bebidas (Yu et al., 2018).

2. Reactividad de los compuestos bioactivos

2.1. Reactividad de los antocianos

Como ya se ha comentado anteriormente, los antocianos son los responsables del color de los productos obtenidos tras el procesado de frutos, por tanto, en concreto, las características de un vino de arándano dependerá en gran medida de la concentración de estos compuestos en el producto final, ya que se ven involucrados en multitud de reacciones que afectan sobre todo al sabor y al color del producto final (Czibulya et al., 2015).

Algunas de las reacciones en las que participan los antocianos pueden ser:

- Equilibrios en función del pH.
- Reacciones de copigmentación.
- Reacciones de degradación.
- Reacciones de formación de piranoantocianos.
- Reacciones entre antocianos y taninos.

2.1.1. Equilibrios de los antocianos en función del pH

Los antocianos pueden encontrarse bajo diferentes formas químicas dependiendo del pH del medio, presentando colores diferentes (Figura 1.19) (Da Costa et al., 1998; Heredia et al., 1998; Kennedy and Waterhouse, 2000).

A pH 1, el catión flavilio (de color rojo) es la especie predominante. En este punto, los antocianos confieren colores rojos y violáceos a los productos. Esto se debe a que el ion posee un déficit electrónico, y según del carbono sobre el que se sitúe la carga positiva (C1, C2, C4, C5, C7 ó C4'), existen seis fórmulas posibles que están en equilibrio. Considerando que los vinos tienen un pH de 3.5 aproximadamente, solo alrededor del 12% de los antocianos libres se encuentra en la forma de catión flavilio roja (Glories, 1984).

La Figura 1.19 muestra los equilibrios de en función del pH de los antocianos. A valores de pH entre 2 y 4, predominan las especies azules quinoidales. A estos valores de pH predomina la base quinónica que presenta una cetona aromática formada a partir de OH fenólicos. En este caso, son tres fórmulas las que derivan en los cationes flavilios correspondientes (AO5, AO7 y AO4'), que a diferencia del caso anterior no están en equilibrio de mesomería (Cheminat and Brouillard, 1986). A pH entre 5 y 6 se tienen dos especies incoloras, la pseudobase carbinol y una calcona. La base carbinol se caracteriza por una función alcohol en posición 2 ó 4 (AOH2 y AOH4). La primera forma deriva de la apertura del heterociclo de una calcona, de color amarillo muy pálido. Sin embargo, la segunda no se ha identificado. En este caso, las calconas, al presentar una función cetona, pueden presentar isomería *cis* y *trans*. A pH superiores de 7, tanto las antocianidinas como las antocianinas o antocianos sufren un proceso de degradación. En el caso de las agliconas, este hecho se produce debido a que a estos pH, los sustituyentes del anillo B y los grupos hidroxilo o metoxilo disminuyen, lo cual reduce la estabilidad de estos compuestos. Contrariamente, los derivados monoglucosilados y los

diglicosilados son más estables a pH neutro, debido a que las moléculas de azúcar evitan la degradación de intermediarios en ácidos fenólicos y acetaldehído (Fleschhut et al., 2006).

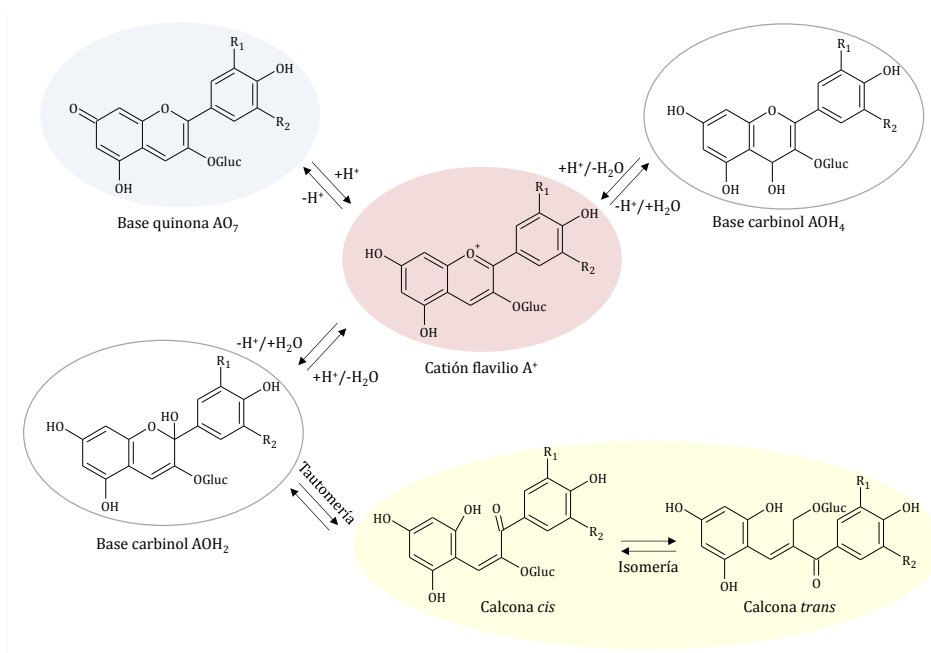


Figura 1.19. Diferentes especies de la molécula de antociano en función del pH.

2.1.2. Reacciones de copigmentación

La copigmentación es reconocido como uno de los fenómenos que más afecta al color de un vino (Czibulya et al., 2015). Esto es debido a la asociación entre los antocianos y otros pigmentos no coloreados, los cuales dan lugar a desplazamientos hiper y batocrómicos en el espectro UV-Vis de los antocianos (Marković et al., 2005; Boulton, 2001; Vivar-Quintana et al., 2002). Este proceso es considerado como uno de los que más estabilizan el color en las plantas (Mazza and Brouillard, 1990; Davies and Mazza, 1993). Los copigmentos pueden ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos, metales u otra molécula de antociano. Algunos autores han comprobado que la copigmentación influye en el color de vinos de uva jóvenes (Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Darias-Martín et al., 2007), afirmando que la contribución al color de estos compuestos podría ser entre un 30 y un 50% (Boulton, 2001; Hermosín-Gutiérrez et al., 2005).

La copigmentación está considerada también como uno de los mecanismos para prevenir contra el ataque nucleófilo de moléculas de agua en la posición C2 (Cavalcanti et al., 2011), ya que los copigmentos son sistemas con pares de electrones libres que son capaces de asociarse con el catión flavilio, deficiente en electrones (Matsufuji et al., 2003) y de otras especies como los peróxidos o el dióxido de azufre en la posición C4 (Mazza and Brouillard, 1987; García-Viguera and Bridle, 1999).

El proceso consiste en la formación de un complejo de estequiometría 1:1 con una estructura final tipo sándwich. Para ello, el antociano (estructura plana) se apila con el copigmento (estructura plana) mediante interacciones débiles de las nubes electrónicas de los anillos aromáticos de ambos (Figura 1.20).

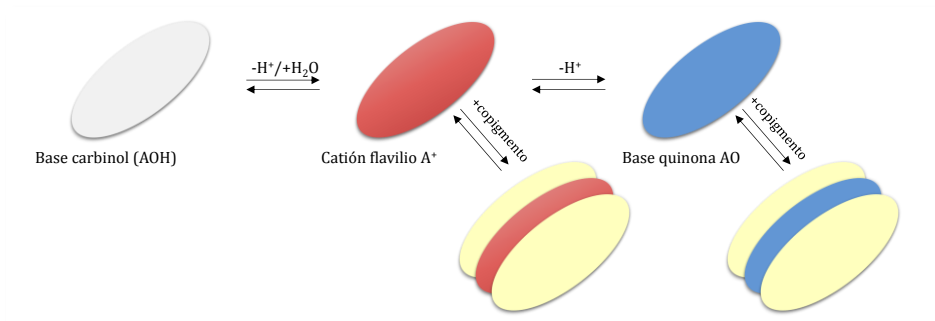


Figura 1.20. Representación del fenómeno de copigmentación.

La copigmentación puede subdividirse en diferentes categorías, según sea la naturaleza del copigmento, dando lugar a diferentes tipos de mecanismos. Cuando el copigmento es otro antociano se da la autoasociación, donde el copigmento es otra molécula de antociano monómero. En el caso de que el copigmento sea una porción de la misma molécula, por ejemplo, un sustituyente, de antociano se denomina copigmentación intramolecular. Cuando la copigmentación se da con un metal, se le conoce como complejación y cuando el copigmento es una molécula diferente a un antociano, con pares de electrones libres (ácidos cinámicos, flavanoles y flavonoles, así como sus glicósidos) se produce la denominada copigmentación intermolecular (Mailen-Aubert et al., 2001; Gómez-Míguez et al., 2006; Gris et al., 2007).

Además, se pueden formar complejos de transferencia de carga cuando el copigmento es otro compuesto fenólico, como por ejemplo, un flavonol. En este proceso, la interacción es transitoria debido a la carencia de enlaces químicos ya que se producen por interacción de cargas opuestas dando lugar a enlaces débiles. En este fenómeno la densidad electrónica es desplazada desde el copigmento (rico en electrones) hasta el ion flavilio, haciendo que aumente la estabilidad y el color rojo.

Los factores que más afectan al proceso de copigmentación son:

- pH. Este parámetro está relacionado con la estructura que presente el antociano. En disoluciones ácidas, los antocianos se encuentran fundamentalmente en la forma de catión flavilio, por lo que los cambios de color al reaccionar con el copigmento no son tan apreciables como cuando el pH es poco ácido, neutro o alcalino, donde los antocianos estarían decolorados, donde si habría una clara evidencia del cambio de color (Rives et al., 2003).
- Temperatura. Un incremento de esta puede ocasionar inestabilidad en los complejos formados, haciendo que la forma catiónica de los antocianos pueda hidratarse y se formen compuestos incoloros. Por otro lado, una disminución

de la temperatura hace que la unión entre el pigmento y el copigmento se refuerce (Rives et al., 2003).

- Sales. Los iones de potasio, sodio o cloro, compiten con el catión flavilio por la solvatación, lo que daría lugar a una reducción de la hidratación de los antocianos, es decir a una disminución de la decoloración. Por tanto, este hecho solo tendría importancia a pH donde se puede dar la hidratación del ion flavilio (Rives et al., 2003).

Algunos autores afirman que la copigmentación influye sobre las reacciones de oxidación, condensación y polimerización de compuestos fenólicos, ya que disminuyen la cinética de estas reacciones que se producen durante el envejecimiento de los vinos (Boulton, 2001), lo que se justifica por la dependencia de la concentraciones de los fenoles en forma libre, ya que si estas formas libres están participando como copigmentos en estas reacciones de copigmetación, su concentración disminuye y por tanto tampoco podrían participar en reacciones de oxidación y polimerización (Darias-Martín et al., 2001). Durante el envejecimiento de un vino, los complejos de copigmentación desaparecen debido probablemente a la transformación de los antocianos monómeros en pigmentos poliméricos (Zhang et al., 2018). Estos compuestos, hacen que el vino sufra una pérdida de intensidad de color rojo y que haya un cambio de tonalidades rojo-púrpuras a rojas y a rojo-anaranjadas.

2.1.3. Reacciones de degradación de los antocianos

Los antocianos se caracterizan por su inestabilidad y por tanto al aumentar el tiempo de envejecimiento el color del vino se modifica con el tiempo, sobre todo en los primeros meses y desaparecen tras el paso de los años. La disminución de estos compuestos, puede deberse además de a las reacciones que se han comentado anteriormente, a reacciones de degradación ya que la estabilidad de estos pigmentos depende de diferentes factores, como son: el tipo de molécula, la concentración, el pH, la temperatura, la oxidación, la intensidad de la luz, presencia de iones metálicos, enzimas, oxígeno, ácido ascórbico, azúcares, sus productos de degradación, dióxido de azufre entre otros, como puede ser la naturaleza de los disolventes en los que se encuentran disueltos (Cevallos et al., 2004). Existe un cierto desconocimiento en cuanto a las reacciones de degradación de estos compuestos se refiere, aunque según las condiciones del medio en que se encuentren pueden dar lugar a compuestos como son las calconas en medio alcalino, malvonas bajo la acción de peróxidos, ácidos fenólicos y cumarinas en soluciones acuosas de pH entre 3 y 7 o dihidroflavonoles en presencia de alcoholes (Ribéreau- Gayon et al., 1998).

Dentro de las reacciones de degradación de los antocianos, encontramos reacciones de degradación térmica, degradación de antocianos en presencia de cetonas, degradación oxidativa de antocianos y degradación de antocianos por ácido ascórbico y oxígeno.

2.1.3.1. Degradación térmica de los antocianos

En la industria alimentaria, el procesamiento térmico es necesario para extender la vida útil de los productos a base de fruta, involucrando temperaturas que van desde 50° hasta 150°C y durante un tiempo especificado antes de un procesamiento posterior para mejorar los atributos de calidad y seguridad. Numerosos autores han estudiado la degradación térmica de los antocianos en diferentes matrices como pueden ser en extractos de cerezas (Turturică et al., 2016a); en ciruelas (Turturică et al., 2016b); en guindas (Oancea et al., 2017); en arándanos (Zhang et al., 2012), demostrando que estas moléculas se vuelven inestables en disoluciones modelo almacenadas a temperaturas (Harbourne et al., 2008; Cao et al., 2009; Cisse et al., 2009; Hernández- Herrero and Frutos, 2011; Hillman et al., 2011). De este modo, algunos estudios han demostrado en vinos modelo de uva que la temperatura de almacenamiento afecta a la degradación del antociano malvidín-3-*O*-glucósido y a la formación de polímeros, viendo que a 42 °C se forman más polímeros que a menores temperaturas (32 °C). Estos polímeros eran menos estables a la degradación y precipitación. Por otro lado, Simpson (1985) propuso dos mecanismos de degradación de antocianos. Uno de ellos mediante la hidrólisis del enlace del 3-glucósido para formar la aglicona más lábil; y un segundo donde habría una hidrólisis y una apertura del anillo pirilo con la formación de una calcona sustituida que se degrada a compuestos fenólicos de color marrón no solubles. Después de un calentamiento, las disoluciones de antocianos contenían productos de degradación como son ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, catequinas, y más moléculas que no se pudieron identificar. Los productos de degradación que se forman dependen del antociano de partida: el 2, 4, 6-trihidroxibenzaldehído es común a todos los antocianos, debido a que se forma a partir del anillo A, pero el otro producto formado es función de las sustituciones del ciclo B de los antocianos (Furtado et al., 1993). Por otro lado, según el mecanismo propuesto por Piffaut et al. (1994), partiendo de malvidín-3-*O*-glucósido y malvidín-3,5-diglucósido, se obtendría primero la correspondiente antocianidina, que daría posteriormente la base carbinol y luego la calcona, a partir de la cual se produce una reordenación dando ácido siríngico y 2, 4, 6-trihidroxibenzaldehído (Figura 1.21).

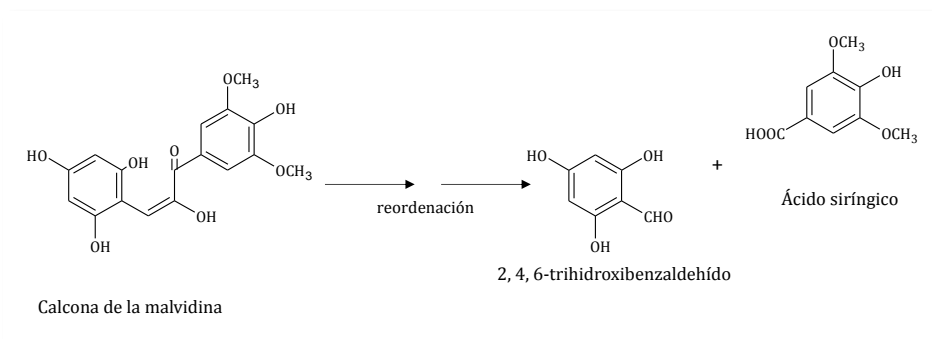


Figura 1.21. Productos de degradación térmica de malvidin-3,5-diglucósido.

Por todo lo comentado anteriormente, la degradación térmica de los antocianos provocaría una decoloración del producto final o sistemas modelo en su caso, que podría interpretarse debido al desplazamiento de los equilibrios hacia las calconas y formas incoloras, siendo este cambio de color prácticamente irreversible.

2.1.3.2. Degradación de antocianos en presencia de cetonas

En vinos tintos de uva, se ha comprobado que la presencia de ácido 2-oxoglucónico y ácido 5-oxoglucónico, es un indicador de vendimias alteradas (Flanzy, 2000). Estos compuestos conducen a tonos naranjas resultado de la formación de compuestos a partir de antocianos y estos ácidos. En un medio acuoso acidificado que contenga acetona, los antocianos dan lugar a compuestos anaranjados (Ribéreau-Gayon, 1998).

Para explicar este hecho, se han propuesto diferentes mecanismos:

1. Hidrólisis de los antocianos y transformación en dihidroflavonoles, con ruptura del heterociclo con formación de ácidos benzoicos.
2. Reacción de la acetona con el antociano, por doble enlace polarizado, con formación de compuestos anaranjados.

2.1.3.3. Degradación oxidativa de antocianos

Como se ha comentado anteriormente, los antocianos pueden sufrir cambios, según en el disolvente en el que se encuentran disueltos. Por ejemplo, estos compuestos, en disolución hidroalcohólica en medio ácido, y expuestos a la luz, se decoloran en pocos días. Esto puede ser debido a que, la luz y el oxígeno actúan como catalizadores, además de deberse a la influencia de la naturaleza del disolvente. Las reacciones de oxidación y polimerización que sufren los antocianos pueden justificar la considerable pérdida de antocianos monoméricos en vinos (Behrends et al., 2017). Este tipo de degradación se ve favorecido por el aumento de temperatura.

Compuestos como los ortodifenoles son fácilmente oxidables ya que pueden actuar como sustratos de determinadas enzimas como las polifenol oxidasas (PPO). Estas enzimas producen compuestos oxidados como son las ortoquinonas (compuestos oxidantes y muy reactivos). Estos compuestos son capaces de oxidar a los antocianos y se forman compuestos antocianos-quinonas que son muy inestables, formándose en un siguiente paso la forma carbinol, que fija las quinonas electrófilas, dando lugar a un producto de adición no coloreado.

2.1.3.4. Degradación de antocianinas por el ácido ascórbico y oxígeno

Las antocianinas pueden degradarse por la combinación del ácido ascórbico y el oxígeno. Markakis et al. (1982) confirmaron un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de pelargonidina-3-O-glucósido.

Otros autores han encontrado en zumos de fresa y sistemas modelo que contenían pelargonidina-3-O-glucósido, que la oxidación del ácido ascórbico causaba grandes pérdidas de antocianinas. Este hecho no sucedía cuando el oxígeno era excluido del zumo o de los sistemas modelo (Sondheimer y Kertesz, 1953, Garzón, 2008). Garzón and Wrolstad (2002) mostraron que la degradación de los antocianos en fresas, se aceleraba cuando el ácido ascórbico estaba presente, tanto en zumos como en sistemas modelo. Este efecto se ha explicado como una posible

reacción de condensación entre el ácido ascórbico y los antocianos por algunos autores (Jurd, 1972; Poei-Langston, 1981). Otro posible mecanismo, es la oxidación del ácido ascórbico a peróxido de hidrógeno, cuando hay oxígeno e iones de cobre o hierro en el medio. Este compuesto resultante, atacaría a los antocianos degradándolos.

2.1.4. Formación de aductos por cicloadición: Piranoantocianos.

Los piranoantocianos son compuestos resultantes de reacciones de condensación sobre antocianos que se modifican tras la sustitución de estos en el carbono C4. Por ejemplo, la vitisina A, que fue el primer piaroantociano que se descubrió, se forma a partir de la cicloadición del ácido pirúvico sobre un antociano y la vitisina B, se forma a partir de la cicloadición del acetaldehído sobre un antociano (Figura 1.22).

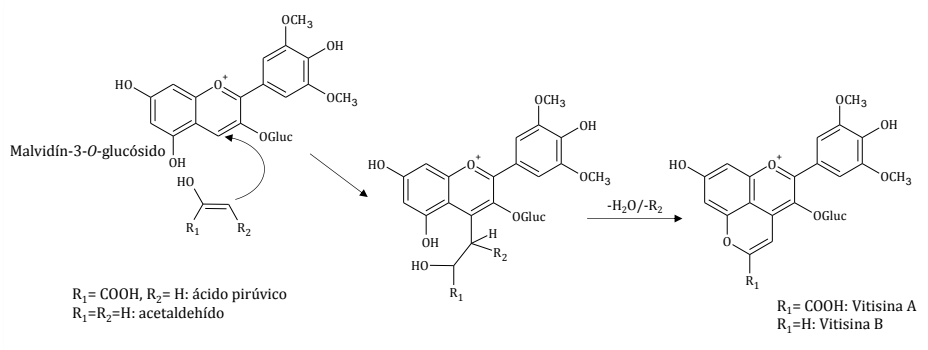


Figura 1.22. Formación de la vitisina A y vitisina B.

Estos compuestos pueden presentar dos formas isoméricas, según si la carga positiva se sitúa sobre el átomo de oxígeno del anillo C o sobre el átomo de oxígeno del anillo D (Figura 1.23).

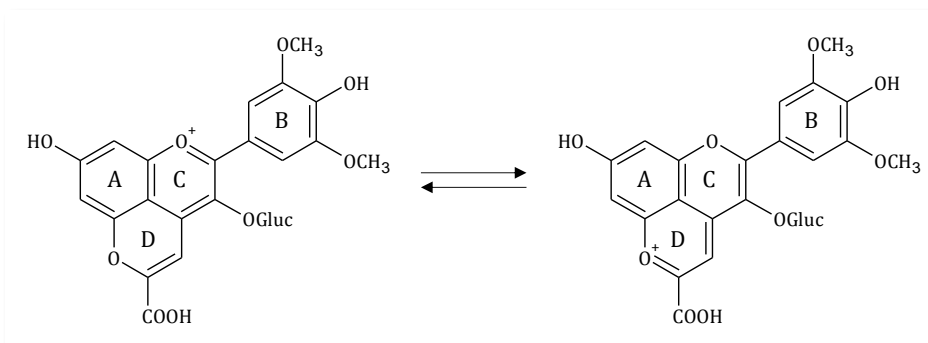


Figura 1.23. Equilibrio de las dos formas catión flavilio de la vitisina A.

Los piranoantocianos se forman durante la fermentación alcohólica y en las etapas posteriores de la elaboración de la bebida (Bakker et al., 1997; Romero and Bakker, 2000). A diferencia de los antocianos, son estables frente a cambios de pH (Francia-Aricha et al., 1999; Oliveira et al., 2006) y frente al efecto del blanqueamiento por el SO₂ (Zamora, 2003; (Vivar-Quintana et al., 2002; Asenstorfer et al., 2006), por lo que hacen que el color en los vinos a lo largo del tiempo sea más estable, lo que es una ventaja en la elaboración de vinos. Además, al incluir el carbono 4 en el anillo D se crea un impedimento estérico haciendo que el piranoantociano sea más estable al aumento del pH (Francia-Aricha et al., 1997; Romero and Bakker, 1999; Asenstorfer et al., 2006), a la degradación oxidativa (Bakker et al., 1997), y a la temperatura (Sarni-Manchado et al., 1996).

Por otro lado, estos compuestos se absorben poco en las paredes celulares de las levaduras ya que se forman normalmente al final de la fermentación, es decir cuando las paredes de las levaduras ya están saturadas de antocianinas (Casassa and Catania, 2006). Estos compuestos aportan al vino colores rojos-anaranjados, debido a un desplazamiento hipsocrómico y un pico de absorción a 420 nm aproximadamente, en el espectro de absorción respecto del antociano de partida (Alcalde-Eon et al., 2006; Asenstorfer et al., 2006; Morata et al., 2007; Fulcrand et al., 1998).

Los piranoantocianos se han determinado en vinos de arándano, viendo que la concentración de antocianinas monoméricas se reducía conforme aumentaba el tiempo de envejecimiento de 0 a 12 semanas debido a la formación de piranoantocianinas y pigmentos poliméricos (Behrends et al., 2017).

2.1.5. Reacciones de condensación de antocianos y taninos

Otro tipo de reacciones por las que se podría producir un decrecimiento de los antocianos monómeros, son las reacciones de condensación entre antocianos y taninos. Estas reacciones se dan por procesos de adición, donde los antocianos y los taninos pueden actuar tanto como agentes electrofílicos, como nucleofílicos (Zimman and Waterhouse, 2004). De esta forma, se han descrito diferentes tipos de condensaciones entre estos compuestos y las han mostrado como unas de vías por la que los antocianos monómeros disminuyen en concentración, tales como reacción directa tanino-antociano, reacción directa antociano-tanino y reacción indirecta a través de un puente metilmetileno.

2.1.5.1. Reacción directa tanino-antociano (T-A)

Este tipo de reacción depende de la concentración de antocianos y de los derivados del flavan-3-ol disponibles en el medio, resultantes de la ruptura en medio ácido de los enlaces interflavanol de las procianidinas (Salas et al., 2004a).

Mediante este tipo de reacción se obtendrían formas poliméricas coloreadas (Salas et al., 2003; Salas et al., 2004b; He et al., 2008; Nave et al., 2010). Estas formas poliméricas se producen a partir de la hidrólisis de las procianidinas con la formación de un carbocatión que reacciona con sitios nucleófilos (Haslam, 1980), como son las posiciones 6 y 8 de los antocianos bajo la forma de base carbinol

neutra (Ribéreau-Gayon et al., 1998). En este caso, el tanino se uniría al antociano a través de la posición C4 del anillo C, formando un complejo incoloro que cambia a un color rojo anaranjado después de su deshidratación (Figura 1.24). Este hecho se ha utilizado como hipótesis de justificación del decrecimiento de antocianos monómeros en vinos de arándano (Behrends et al., 2017).

Esta reacción proporcionaría información de la evolución del color en el envejecimiento de los vinos en depósitos y botellas, ya que se ve favorecida por la ausencia de oxígeno (condiciones reductoras) y la temperatura.

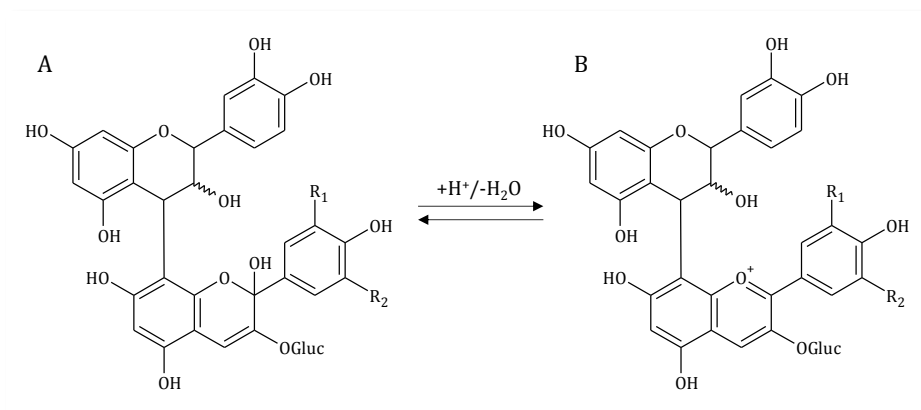


Figura 1.24. Estructuras del complejo tanino-antociano en forma hemiacetal (A) y en forma flavilio (B).

2.1.5.2. Reacción directa antociano-tanino (A-T)

En este caso, sería el antociano el que se encontraría en forma catiónica (A^+). Esta forma catiónica reaccionaría con las posiciones negativas C6 o C8 de los taninos, dando lugar a flavenos que son compuestos no coloreados (A-T) (Santos-Buelga et al., 1999). Este último, se oxidaría hasta el estado flavilio (A^{+} -T) de color rojo, en presencia de oxígeno (Santos-Buelga et al., 1995a; Pati et al., 2006) estableciéndose un equilibrio entre ambas formas, A^{+} -T y A-T como se muestra en la Figura 1.25.

Los compuestos A^{+} -T son resistentes a la decoloración por SO_2 , mientras que los aductos T- A^{+} serían más susceptibles a dicha decoloración y a la hidratación.

Este tipo de reacción transcurre a gran velocidad durante la vinificación y el envejecimiento del vino, ya que los antocianos monómeros disminuyen rápidamente y son reemplazados por formas coloreadas más complejas que contribuyen en un 85% al color de vinos tintos de 10 años (Somers, 1971).

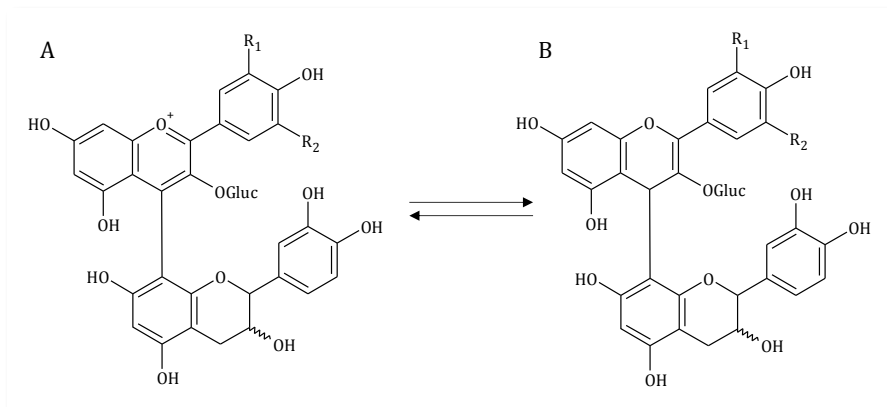


Figura 1.25. Estructuras del complejo antociano-tanino en forma flavilio (A) y en forma hemiacetal (B).

2.1.5.3. Reacción indirecta a través de un puente metilmetileno

Se ha demostrado que la presencia de estos derivados origina una mayor estabilización del color del vino frente a cambios de pH y la acción blanqueante del SO₂ (Somers and Evans, 1977; Bakker et al., 1993), aunque parece ser que son más inestables en soluciones acuosas (Escribano-Bailón et al., 2001).

Como se puede ver en la Figura 1.26, en este tipo de reacción los antocianos y los taninos pueden unirse por medio de una reacción en la que interviene el acetaldehído. Esta reacción se produce como resultado de que al pH del vino, una pequeña proporción de acetaldehído se encuentra en su forma protonada, y puede reaccionar con las posiciones nucleofílicas C8 o C6 del anillo A de una molécula de flavanol. A partir de esto, se formaría un aducto, por el cual, el acetaldehído queda unido al flavanol, que resultaría en un ion que puede atacar en la posición C8 del anillo A del antociano, que formaría la forma antociano-metilmetileno-flavanol.

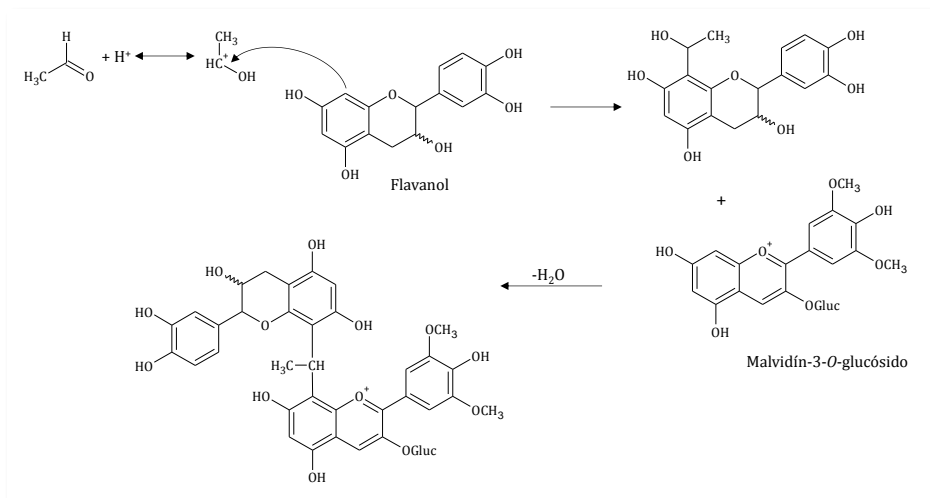


Figura 1.26. Mecanismo de formación de los aductos flavanol-metilmetileno-antociano.

Este último compuesto podría desprotonarse dando lugar a una base quinoidal de color violeta como se puede ver en la Figura 1.27 (Es-Safi et al., 2002; Pissarra et al., 2004; Sun et al., 2008). Algunos autores han mostrado que la formación de este tipo de compuestos da lugar a un desplazamiento del color hacia tonos violetas en disoluciones modelo (Dallas et al., 1996a; Escribano-Bailón et al., 2001) y en vinos tintos experimentales (Vivar-Quintana et al., 1999) debido a un desplazamiento batocrómico de λ_{max} de absorción hasta 530-540 nm.

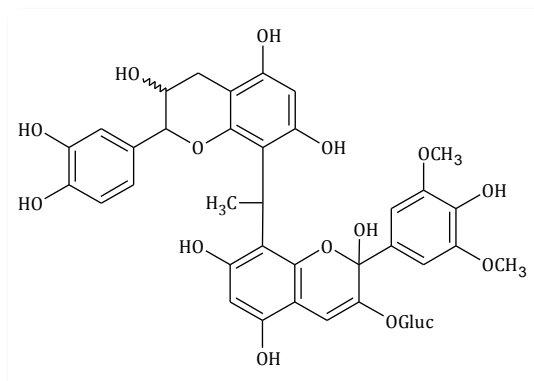


Figura 1.27. Estructura de la base quinoidal del aducto flavanol-metilmileno-antociano.

El puente metilmileno presenta un carbono asimétrico, por lo que cada uno de estos isómeros anteriores presentan además dos diastereoisómeros (*R* o *S*) (Rivas-Gonzalo et al., 1995; Escribano-Bailón et al., 1996). Entre los productos enlazados por puente metilmileno pueden incluirse taninos (T-metilmileno-T), aductos de taninos-antocianos (T-metilmileno-A) y antocianos entre sí (A-metilmileno-A), siendo la diferencia de tamaño entre ellos poco acusada.

2.1.6. Reacciones de formación de dímeros de antocianos

Los antocianos pueden reaccionar entre sí, formando dímeros antociano-antociano. Estos compuestos presentan estructuras similares a las de las proantocianidinas tipo B y tipo A (Vidal et al., 2004; Salas et al., 2005; Alcalde-Eon et al., 2007; Pati et al., 2009), como se muestra en la Figura 1.28.

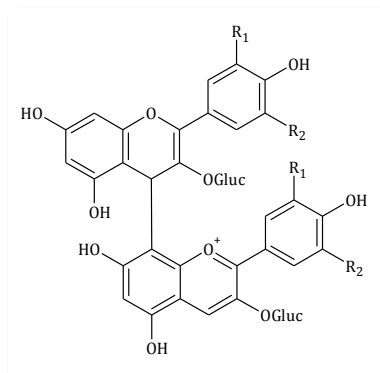


Figura 1.28. Estructura de un dímero antociano-antociano.

2.2. Reacciones de oxidación de compuestos fenólicos

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son radicales de oxígeno, como pueden ser $O_2^{\cdot-}$, y sus ácidos conjugados (HOO^{\cdot}), hidroxilo (OH^{\cdot}), peroxil (ROO^{\cdot}), alcoxil (RO^{\cdot}). Existen además otras especies potentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el ozono, el ácido hipocloroso, el oxígeno singlete, etc. Se sabe que estas especies se pueden producir en vinos por mediación de iones hierro (Waterhouse and Laurie, 2006).

Las reacciones de oxidación en productos vegetales, tales como zumos, vinos u otros procesados, son el proceso que más afecta a las propiedades organolépticas ya que puede ocasionar pérdida de color, sabor, aroma y valor nutricional (Ferreira et al., 1997; Escudero et al., 2002; Silva Ferreira et al., 2002; Sioumis et al., 2005). En estas reacciones se ven involucrados compuestos fenólicos, metales, aldehídos, azúcares y compuestos sulfurados (Oliveira et al., 2011). Estas reacciones dan lugar a compuestos de color pardo. La reacción de Maillard es la reacción de pardeamiento más conocida.

Por otro lado, se sabe que la oxigenación podría mejorar la evolución de los vinos tintos durante el envejecimiento, pero también podría agotar la cantidad de algunos compuestos fenólicos monoméricos y oligoméricos que son beneficiosos para la salud. Además, los cambios en los pigmentos del vino tinto incluyen la formación de metilantociano-catequina y piranoantociano-catequina, mediados por acetaldehído liberado durante la oxidación del vino (oxidación de etanol) (Mateus et al., 2002).

La concentración de SO_2 , es un factor influyente en los cambios oxidativos que se dan durante la microoxigenación de un vino. Tao et al. (2007) observaron que la adición de dióxido de azufre en un rango de 0 a 200 mg/L, causaba cambios en la composición y en el color de los vinos, siendo los vinos con mayores concentraciones de dióxido de azufre los que presentaron mayor pérdida de antocianinas y derivados de flavan-3-oles, y mostraron mayor formación de pigmentos no blanqueantes e incremento en la intensidad de color de los vinos.

Los vinos blancos contienen menor cantidad de compuestos fenólicos que los vinos tintos, pero los principales componentes de los vinos blancos son los ácidos fenólicos que juegan un papel muy importante en cuanto a las reacciones de oxidación y los cambios en las características de los vinos (Oliveira et al., 2011).

2.2.1. Reacciones de oxidación enzimática

Estas reacciones se suelen dar en los zumos/mostos de partida para la obtención de vinos. Un mecanismo probable para la oxidación de compuestos fenólicos involucra la hidroxilación en la posición *orto* adyacente a un hidroxilo existente grupo del sustrato fenólico (actividad monofenol oxidasa), y oxidación de *orto*-dihidroxibencenos a *orto*-benzoquinonas (actividad difenol oxidasa).

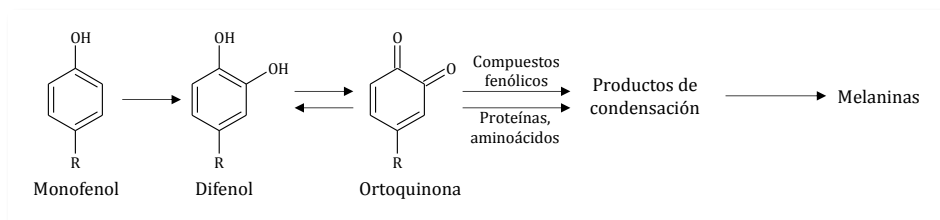


Figura 1.29. Proceso de pardeamiento enzimático.

Las tres clases principales de enzimas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos son:

- Oxidorreductasas que usan oxígeno como aceptor de electrones. Se incluyen enzimas que usan catecoles o compuestos relacionados como donantes de electrones y oxígeno como aceptor de electrones haciendo que el compuesto donador se oxide y produciendo agua (Oliveira et al., 2011). Dentro de ellas se encuentran las polifenoloxidasas (PPO), conocidas también como catecol oxidasa, difenoloxidasas, fenoloxidasas, tirosinasas, *o*-difenolasas y fenolasas; lacasas y ortoaminofenoloxidasas (Li et al., 2008). Las PPO, cuando los alimentos están intactos, es decir, cuando los compuestos fenólicos se encuentran en las vacuolas de las células vegetales y las oxidoreductasas en el citoplasma, no pueden llevar a cabo ningún tipo de oxidación. Sin embargo, en cuanto que las células se rompen, y se ponen en contacto con aire, las enzimas comienzan el proceso de pardeamiento enzimático (Cheynier and Moutounet, 1992), que normalmente ocurre durante la vinificación, aunque hay autores que han encontrado este tipo de pardeamiento también durante el secado de uvas (Serratosa et al., 2009). Las PPO son metaloproteínas con cobre como grupo prostético, y en presencia de oxígeno molecular son capaces de catalizar tres tipos de reacciones, dependiendo del sustrato específico: actividad cresolasa: *o*-hidroxilación de monofenol a *o*-difenol (Singleton, 1987); actividad catecolasa: oxidación de *o*-difenol a *o*-quinona; actividad lacasa: oxidación de *p*-difenoles en *p*-quinonas (Toit et al., 2006).
- Monofenol monooxigenasa o tirosinasa: cataliza las mismas reacciones que la anterior, pero solo si hay catecoles como sustratos de oxidación.
- Peroxidasa: que usa el peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones para oxidar al donante, formando así el donante oxidado y agua.

2.2.2. Reacciones de oxidación no enzimática

En este tipo de reacciones de oxidación se produce la oxidación de polifenoles que contienen un resto *o*-dihidroxibenceno (anillo catecol) o un radical 1,2,3-trihidroxibenceno (grupo galoilo), tales como (+)-catequina, (-)-epicatequina, galocatequina, ácido gálico y sus ésteres, y ácido cafeico (Singleton, 1987; Kilmartin et al., 2001; Danilewicz, 2003; Li et al., 2008). En este caso, los sustratos se oxidan a *o*-quinonas produciendo radicales libres semiquinona, y el oxígeno se reduce a H_2O_2 (Danilewicz, 2003; Waterhouse and Laurie, 2006), actuando los ciclos redox de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ y $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$ como catalizadores (Danilewicz et al., 2008).

(Figura 1.30). Otros compuestos como malvidina, ácido *p*-cumárico y resveratrol se pueden oxidar a potenciales mayores (Kilmartin et al., 2001).

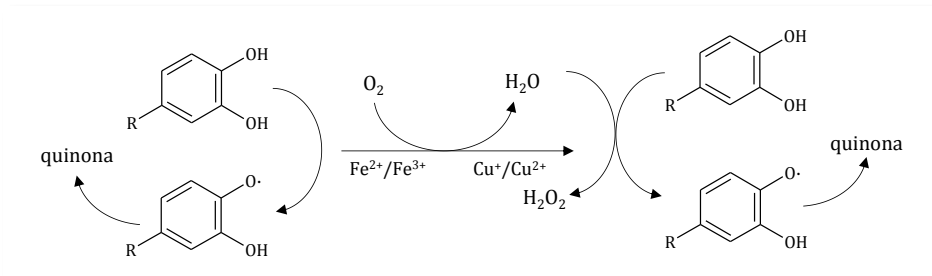


Figura 1.30. Reacción de oxidación no enzimática de compuestos fenólicos.

Los compuestos resultantes son bastante inestables y pueden dar lugar a numerosas reacciones en las que se forman pigmentos por una vía similar a la del pardeamiento enzimático (Singleton, 1987; Robards et al., 1999). Algunas reacciones que se pueden producir son las de condensación en las que se forman productos coloreados de alto peso molecular, o reacciones de reducción para regenerar los fenoles originales tras atrapar átomos de hidrógeno de otros compuestos (Li et al., 2008). Estas quinonas pueden combinarse con compuestos nucleófilos, como son algunos fenoles, compuestos sulfhídricos y aminas, produciendo dímeros o polímeros, que reorganizan su estructura para dar lugar a nuevos difenoles.

Sin embargo, en los vinos tintos, todos los aldehídos involucrados en estas reacciones (acetaldehído, ácido glioxílico, furfural e hidroximetilfurfural), interaccionan preferentemente con los antocianos para dar lugar a compuestos coloreados estables, los cuales se han estudiado tanto en soluciones modelo como en vinos (Es-Safi et al., 2003).

2.2.3. Reacción de Maillard

Esta reacción fue descrita por primera vez por el investigador francés Louis-Camille Maillard (1878-1936) y es una reacción de pardeamiento no enzimático (Hodge, 1953). Esta reacción da lugar a la condensación del grupo carbonilo libre de los azúcares reductores con un grupo amino de aminoácidos, péptidos o proteínas. Esta reacción ocurre en los alimentos durante su procesado, tostado, secado o cocinado (Delgado-Andrade et al., 2010) e incluso durante su almacenamiento. Esta reacción se ve afectada por factores físicos y químicos como pH, a_w y temperatura (Frank et al., 2004).

El desarrollo de la reacción de Maillard ocurre preferentemente a temperaturas superiores a 50°C y pH entre 4 y 7 (Oliveira et al., 2011). En esta reacción se forma una mezcla compleja de compuestos de diferentes pesos moleculares (MRPs, productos de la reacción de Maillard), entre los que se incluyen aldehídos, cetonas, dicarbonilos, acrilamidas y aminas heterocíclicas, que contribuyen al flavor, pero también compuestos finales de la glicosilación no enzimática

(advanced glycation endproducts, AGEs), que son productos poliméricos formados en las etapas avanzadas de la reacción de Maillard (Wang et al., 2011), y melanoidinas, de color pardo (Figura 1.31).

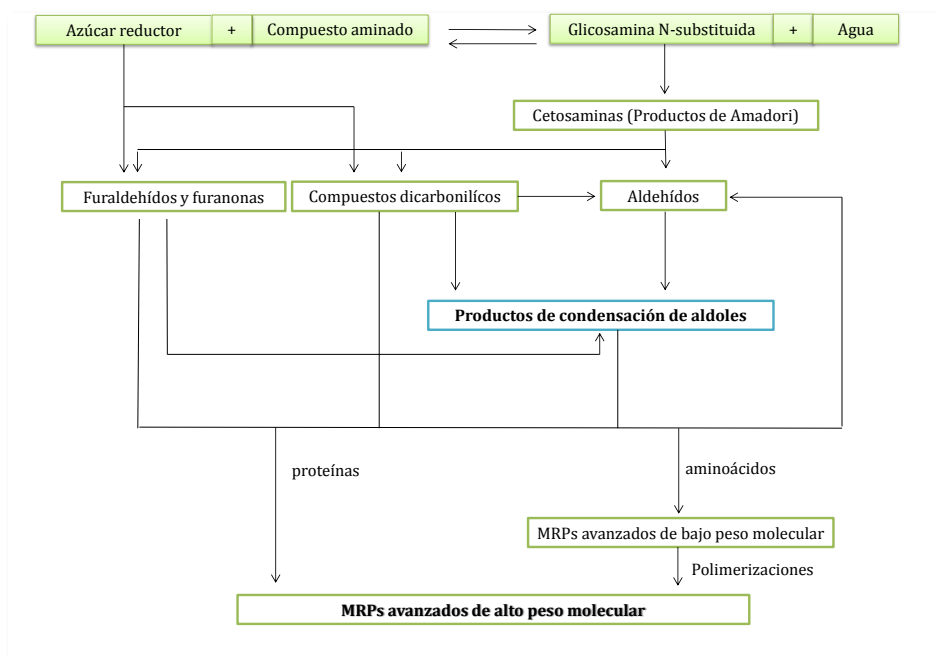


Figura 1.31. Esquema general de la reacción de Maillard

La reacción de Maillard ha sido ampliamente estudiada en alimentos, pero concretamente en vinos existen pocos trabajos relacionados con la misma (Di Mattia et al., 2007; Serratosa et al., 2008; Perestrelo et al., 2018). En los vinos, esta reacción se puede dar durante la vinificación, especialmente cuando se produzcan etapas como la termovinificación o el embotellado a alta temperatura, debido a que el vino contiene los sustratos necesarios para que se desarrolle la reacción de Maillard (Ribéreau-Gayon et al., 1998). También se produce en procesos de elaboración que precisan de un proceso previo de secado de las uvas, como en la obtención de vinos dulces (Serratosa et al., 2008).

Existen estudios que afirman que muchos compuestos volátiles responsables del aroma de algunos vinos dulces, podrían estar relacionados con productos de las reacciones de Maillard entre azúcares y aminoácidos (Cutzach et al., 1998; Cutzach et al., 1999; Marchand et al., 2002; Perestrelo et al., 2018).

2.2.3.1. Primera etapa de la reacción de Maillard

En los primeros pasos de la reacción se produce una condensación entre el grupo amino y el grupo carbonilo del azúcar reductor, para formar una glicosamina o base de Schiff. Esta última base se disocia rápidamente sufriendo una reordenación de Amadori debido a una catálisis de protones (Figura 1.32).

En esta reacción, ocurre el desplazamiento de un átomo de hidrógeno a la posición 1, para dar los compuestos de Amadori (ARPs), que son 1-amino-1-desoxicetosas *N*-sustituidas. Si el azúcar de partida es una cetosa y no una aldosa, los compuestos resultantes se denominan de Heyns (HRPs).

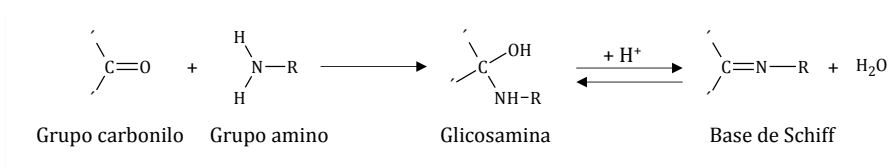


Figura 1.32. Primera etapa de la reacción de Maillard.

2.2.3.2. Reacciones de Maillard avanzadas: formación de dicarbonilos.

Los productos de Amadori obtenidos en la primera etapa, son bastante estables en alimentos con baja actividad de agua, pero pueden sufrir varias reacciones de degradación durante el calentamiento o el almacenamiento prolongado. Estos compuestos darían lugar a 1,2-dicarbonilos, de los cuales la 3-desoxiglucosona (Anet, 1960), 1-desoxiglucosona (Glomb and Pfahler, 2000), metilglioxal y glioxal (Thornalley, 1996) serían las estructuras más importantes. La enolización, la eliminación de agua y las reacciones de retroaldolización son algunos de los mecanismos reacción que se creen posibles (Weenan, 1998). Los dicarbonilos, son compuestos altamente reactivos con proteínas, y forman parte de formación de compuestos heterocíclicos de bajo peso molecular, responsables de las alteraciones del color y del sabor en los alimentos. En la Figura 1.33 se muestra el mecanismo de degradación de productos de Amadori a 1,2 dicarbonilos.

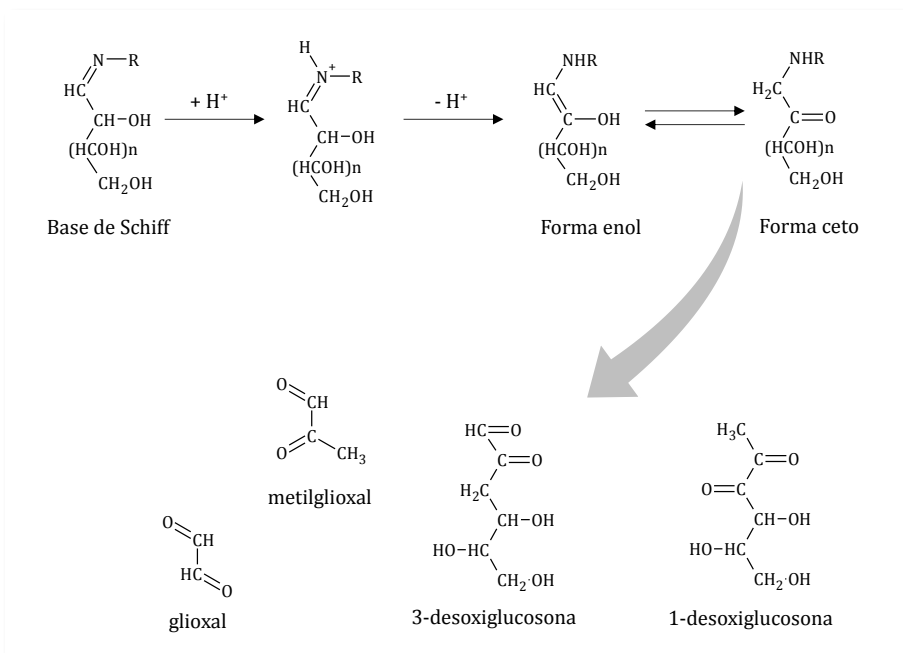


Figura 1.33. Formación de los compuestos dicarbonílicos.

A través de la 1,2-enolización del derivado Amadori de la glucosa, se puede producir 5-hidroxi metilfurfural (5-HMF) (Ledl and Schleicher, 1990). Aunque si se da primero una 2,3-enolización, se favorece la disociación del resto amino en posición alílica para formar una 1-desoxihexosona, cuya descomposición daría lugar a dicetonas, furanonas o furanos (Figura 1.34).

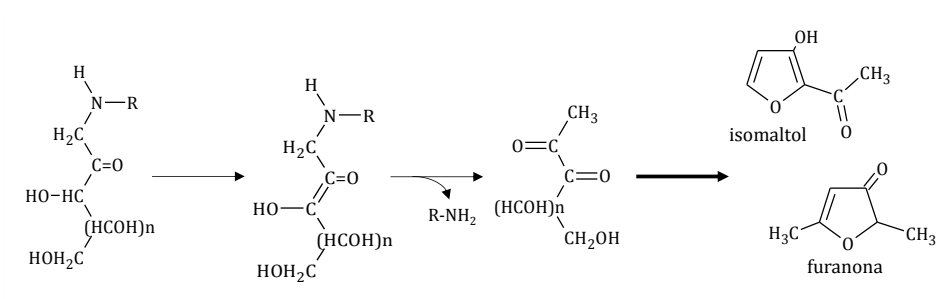


Figura 1.34. Reacción de 1,3 enolización para dar compuestos tipo furano.

Durante estas etapas intermedias de la reacción de Maillard, se pueden generar multitud de compuestos entre los que se encuentran, los α -dicarbonilos, aldehídos, furaldehídos y furanonas, que rápidamente reaccionan con otras en una condensación aldólica. Se pueden formar también furaldehídos y furanonas a partir de la degradación de las aldosas.

2.2.3.3. Reacciones finales de Maillard: formación de compuestos finales.

En la fase final de la reacción de Maillard se produce la reacción de los compuestos nombrados anteriormente con aminas, aminoácidos, aldehídos, sulfuro de hidrogeno y amoníaco. Ocurren así ciclaciones, deshidrataciones, retro-aldolizaciones, reordenamientos, isomerizaciones y condensaciones adicionales. Cuando los productos intermedios reaccionan con aminoácidos pueden formar compuestos denominados MRPs (Figura 1.35), los cuales pueden dar lugar a compuestos de bajo peso molecular (LMW), que pueden polimerizarse llegando a formar compuestos de mayor peso molecular (HMW).

Las melanoidinas y los AGEs son los compuestos resultantes más importantes de la reacción de Maillard. Se sabe que estos compuestos presentan fluorescencia y que por ello, esta reacción se puede monitorizar antes de que se produzca el pardeamiento (Chuyen, 2006). Los AGEs también pueden formarse a partir de productos intermedios con proteínas (Wang et al., 2011). Los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) se pueden encontrar en la bibliografía desde mediados de los años 1980 (Brownlee et al., 1984). En alimentos se han detectado derivados como la monolisilamida del ácido glioxálico, que es un derivado de aminoácidos resultantes de las reacciones de Maillard (Henle, 2005) o la aminoreductona (Pischetsrieder et al., 1998). Otros derivados de aminoácidos que se obtienen de la reacción de Maillard son la propil-imidazolinona-ornitina y la pirazinona.

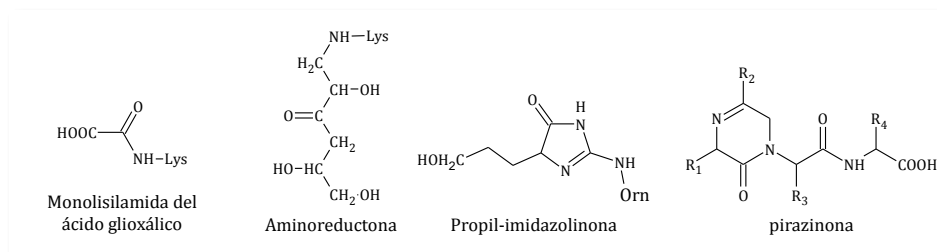


Figura 1.35. Derivados de aminoácidos formados durante la reacción de Maillard.

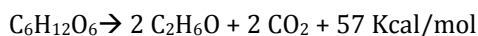
Las melanoidinas son los últimos productos formados durante la reacción de Maillard. Su formación depende del tipo de alimento, tecnología alimentaria, temperatura, tiempo, composición de aminoácidos y azúcares reductores (Martins and Van Boekel, 2003; Kim and Lee, 2008b; Eun et al., 2005; Kim and Lee, 2008a). Estos compuestos son pigmentos marrones no homogéneos que presentan un máximo de absorción a 420 nm. Este hecho hace que estos compuestos sean interesantes en la industria alimentaria, ya que son responsables del color de alimentos como el café, el pan, la malta o la miel.

3. Fermentación alcohólica

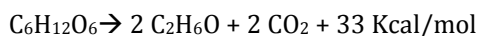
Las bebidas alcohólicas son soluciones aromatizadas de etanol, derivadas de numerosos sustratos, que pueden ser cereales, uvas u otras frutas, o carbohidratos (Lee, 1996). La fermentación alcohólica se utilizaba como un método de conservación de alimentos antes de ser usada para la obtención de bebidas de frutas fermentadas. Este proceso fue determinado cuantitativamente por Lavoisier en 1743-1794, quien enunció el principio de conservación de la materia y presentó la ecuación algebraica para este proceso:

$$\text{Mosto de uva} = \text{Ácido carbónico} + \text{Alcohol}$$

Fue posteriormente, Gay-Lussac entre 1778 y 1850 quien expresó lo mismo con la ecuación que lleva su nombre:



Actualmente, los resultados obtenidos por Gay-Lussac y más tarde por Pasteur, se han afinado utilizando aparatos de medida. El balance obtenido (aunque se cree incompleto) podría ser el siguiente:



La reacción es exotérmica y productora de un gran volumen de gas carbónico. Por ello, se produce la efervescencia en el zumo y la temperatura aumenta en el medio durante la fermentación. La fermentación alcohólica es la transformación de azúcar a alcohol, pero en este proceso intervienen numerosos mecanismos muy complejos. En estos mecanismos intervienen enzimas específicas, liberadas por las levaduras o que están en el medio. Además del alcohol, la fermentación alcohólica en vinos da lugar a numerosos compuestos responsables en gran parte de las propiedades organolépticas del producto final. Algunos de estos compuestos son el ácido acético, responsable de la acidez volátil de un vino; el dióxido de carbono, que se genera durante la fermentación tras la conversión de los azúcares a alcohol etílico; glicerol, que da lugar a la consistencia de los vinos; diversos ácidos carboxílicos y alcoholes superiores, aldehídos, cetonas, ésteres, etc., que aportan a la bebida aromas secundarios provenientes de la fermentación o de la maceración. Se ha demostrado en numerosos estudios que la fermentación alcohólica da lugar a la formación de compuestos fenólicos derivados de la misma y por tanto a un importante cambio del perfil fenólico (Behrends et al., 2017).

3.1. Descripción del ciclo fermentativo

El seguimiento de un proceso fermentativo a temperatura constante, se puede llevar a cabo a través de la liberación de gas carbónico y de la velocidad instantánea de esa liberación (proporcional a la velocidad de fermentación). El proceso de fermentación da lugar a una curva de fermentación que se divide en tres fases:

- *Fase inicial o de latencia:* Esta fase se corresponde con el periodo de saturación del medio en CO₂. Al final de esta fase, la población es aproximadamente de 10⁷ células/mL. En este tiempo, las levaduras están

consumiendo principalmente oxígeno, para multiplicarse. La duración de esta fase depende sobre todo de la temperatura de fermentación.

- *Fase de crecimiento:* Esta fase dura hasta el final del crecimiento celular. Durante la misma, se alcanza el máximo de liberación de dióxido de carbono. La velocidad máxima se corresponde con la actividad máxima alcanzada por las levaduras para la conversión de los azúcares en etanol. La velocidad máxima de liberación de gas carbónico es muy interesante ya que permite: detectar carencia de nitrógeno en el medio (Bely et al., 1990); este parámetro está ligado a la liberación máxima de calor y por lo tanto a la máxima necesidad de frigorías, las cuales son fundamentales para la regulación de la temperatura; permite estimar la duración de la fermentación (Bely et al., 1990).
- *Fase final o estacionaria:* En este tramo de la fermentación alcohólica, las levaduras ya no son proliferantes. La actividad de las mismas decrece aunque, en la mayoría de los casos se consigue una fuerte tasa de viabilidad.

3.2. Proceso de fermentación

La degradación de los azúcares por las levaduras comprende la primera fase de la fermentación alcohólica mediante vía glicolítica, donde los glucósidos C6 son transformados en ácido pirúvico (en la denominada vía Embden-Meyerhof-Parnes). En un primer paso, la glucosa y la fructosa son convertidas en sus ésteres fosfóricos, mediante fosforilación, mediante la acción de la hexoquinasa. Tras esto, se produce una isomerización llevada a cabo por la enzima fosfoglucosa isomerasa para el caso de la glucosa y tras una nueva fosforilación, se produce fructosa-1-6-difosfato (Figura 1.36).

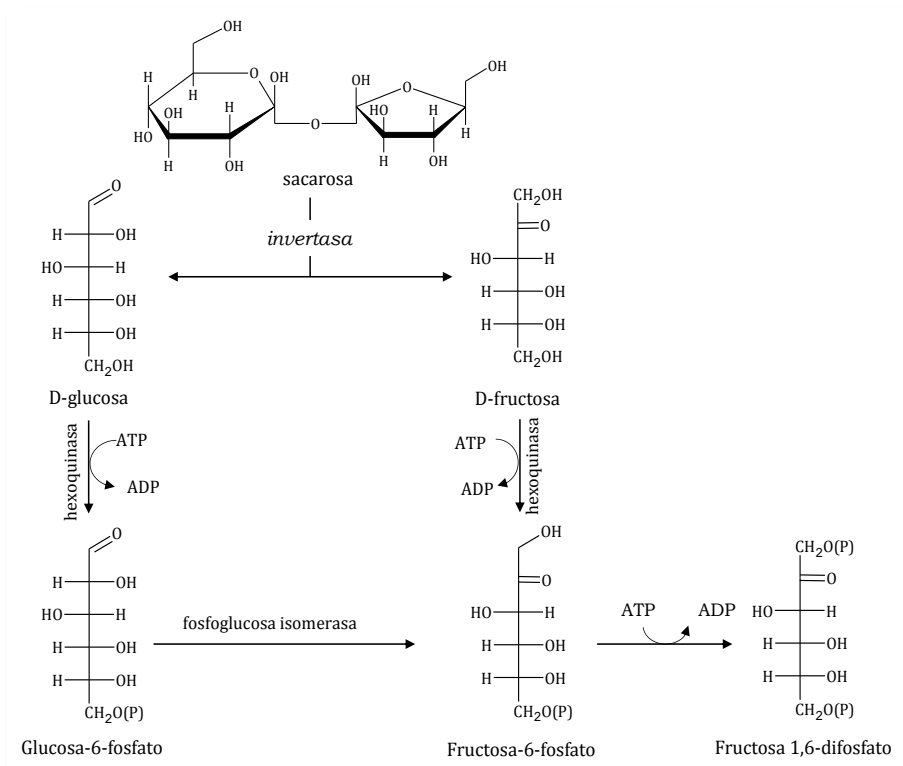


Figura 1.36. Primeros pasos de vía Embden-Meyerhof-Parnes.

Este producto es la base de partida, mediante la aldosa y la formación de dos triosas isómeras: gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato, en equilibrio. La dihidroxiacetona-fosfato se comporta como un almacén de gliceraldehído-3-fosfato, conforme se va gastando este, el equilibrio se desplaza y se forma más de este compuesto, ya que sólo este compuesto es el que interviene en reacciones posteriores. El gliceraldehído-3-fosfato mediante la enzima gliceraldehído-3-fosfato hidrogenasa, el NAD^+ y el fósforo inorgánico, pasa a 1,3-difosfoglicerato, que pasa a 3-fosfoglicerato, mediante la enzima fosfoglicerato quinasa y se forma ATP. Este último compuesto se isomeriza, en presencia de fosfoglicerato mutasa a 2-fosfoglicerato, que pierde una molécula de agua y con la piruvato quinasa, da lugar a piruvato, obteniéndose ATP (Figura 1.37). El balance neto de la glicólisis es de 2 ATP netos, ya que se forman 4 ATP y se consumen 2 de ellos en la fosforilación inicial.

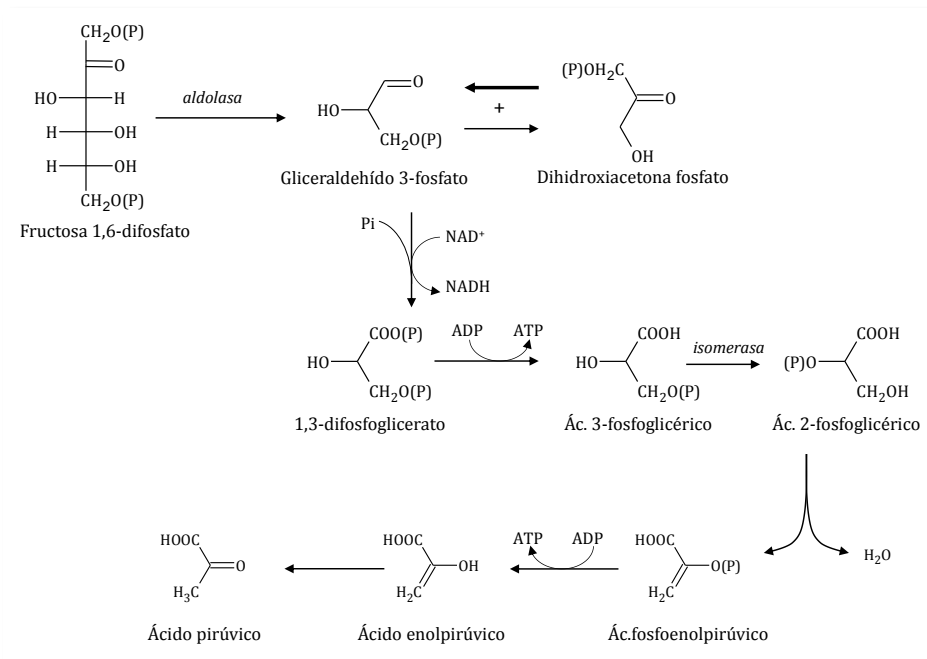


Figura 1.37. Formación de ácido pirúvico a partir de fructosa 1,6 difosfato.

Una vez formado el ácido pirúvico, este se descarboxila pasando a acetaldehído y por reducción pasa a etanol (Figura 1.38). Para ello es necesario NADH₂, que es formado en el transcurso de la oxidación del gliceraldehído a ácido glicérico. Por tanto, estas dos vías están acopladas y se tienen que dar las dos para que el proceso se lleve a cabo.

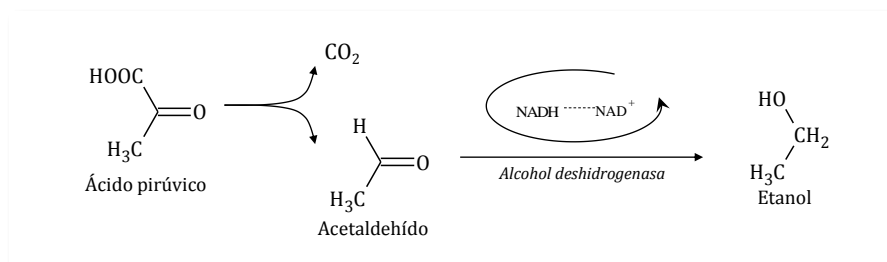
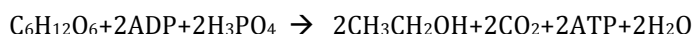


Figura 1.38. Obtención de etanol a partir de ácido pirúvico.

En conjunto, el balance energético de la fermentación alcohólica, es igual que el de la glicólisis, es decir, de cada molécula de azúcar de partida se forman dos de gliceraldehído-3-fosfato, del que se obtienen 4 ATP y se consumen 2 ATP en la fosforilación. El balance final por tanto es la producción de 2 ATP por cada molécula de azúcar que es transformada en etanol.



3.3. Otras reacciones

Además de la producción de alcohol, durante la fermentación se pueden formar otros compuestos secundarios que aportan a las bebidas finales propiedades tales como cuerpo, aroma, suavidad en boca, etc...

Durante la fermentación, no todas las moléculas de azúcar participan en la fermentación alcohólica y algunas de ellas pueden formar parte de la fermentación gliceropirúvica, que da lugar a glicerol mediante la reducción de la dihidroxiacetona fosfato proveniente de la degradación de la fructosa-1,6-difosfato en la ruta de Embden Meyerhoff (Figura 1.39). La glicerina o glicerol aportan características en la estructura, sabor y suavidad de los vinos. Además parte del componente dulce de los vinos secos es debido a la glicerina.

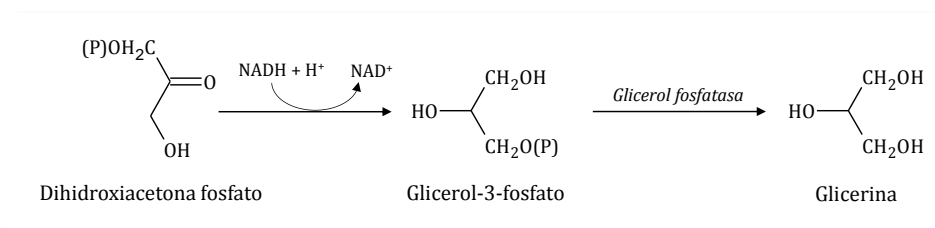


Figura 1.39. Formación del glicerol en la fermentación alcohólica.

Otro producto, en este caso no deseable, que puede formarse durante la fermentación en las bebidas, es el ácido acético. De este producto no deseable se pueden formar también sus ésteres. De esta misma transformación se puede producir, aunque en niveles bajos, el ácido fórmico y otros productos secundarios que afectan a la calidad de los vinos. El piruvato puede sufrir una descarboxilación oxidativa. Esta ruta está mediada por el complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa que transforma al piruvato en acetil-CoA. Parte del acetil-CoA, finalmente puede ser hidrolizado por la enzima, acetil-CoA hidrolasa, dando lugar a acetato. Esta vía está limitada en las condiciones de anaerobiosis durante la fermentación.

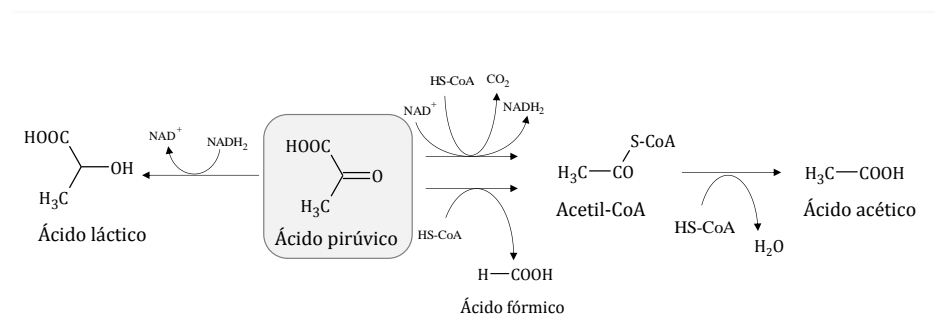


Figura 1.40. Formación de ácido acético durante la fermentación alcohólica.

Por otro lado, en condiciones anaeróbicas el ácido acético puede formarse por descarboxilación del piruvato a acetaldehído. Esta reacción es catalizada por la enzima piruvato descarboxilasa y posteriormente se produce la oxidación a

acetato por la acetaldehído deshidrogenasa, enzima que necesita NADP. Finalmente, el acetato puede activarse a acetil-CoA a través de una reacción catalizada por la acetil-CoA sintetasa. El acetil-CoA se destina a la biosíntesis de ácidos grasos saturados y de ésteres de acetato. Esta vía denominada *by pass* de la piruvato deshidrogenasa es la principal responsable de los altos niveles de acetato en condiciones anaeróbicas.

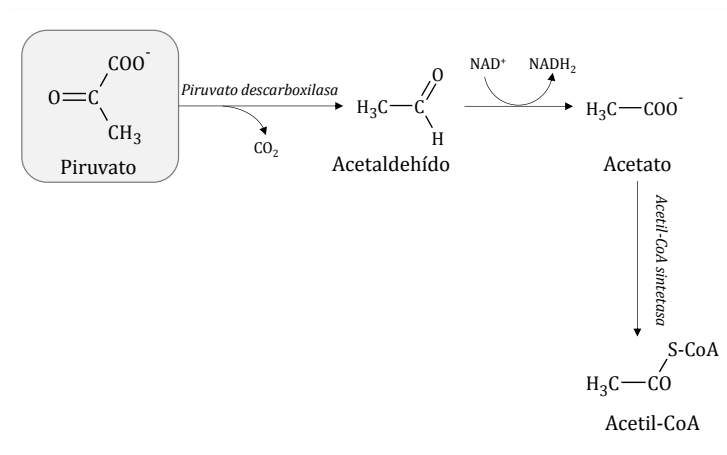


Figura 1.41. Formación de acetil-CoA a partir de piruvato.

Algunas especies como la acetoina, el diacetilo o el 2,3-butanodiol, suelen estar presentes en los vinos. Aunque la generación de este último puede tomarse como una contribución al equilibrio aromático del vino (Shinohara, 1984), la presencia de diacetilo, por el contrario se toma como un defecto debido a su olor y bajo umbral de percepción (Dubois, 1996). Estos compuestos se forman a partir de la condensación de dos moléculas de pirúvico seguida de descarboxilación como se puede ver en la Figura 1.42.

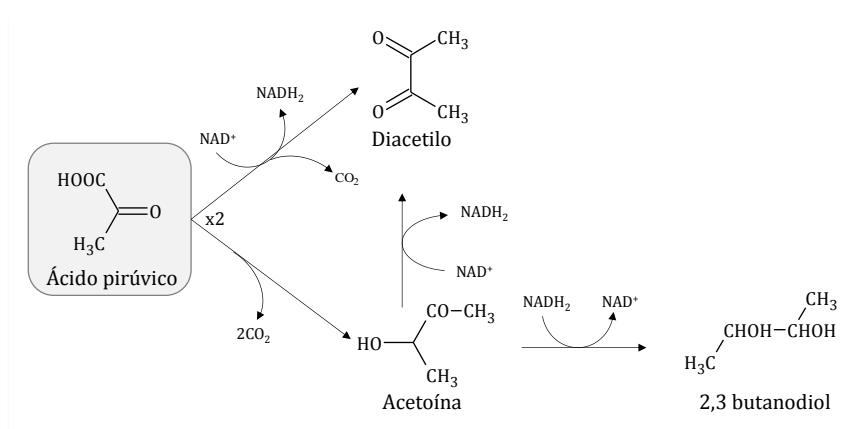


Figura 1.42. Formación de acetoina, diacetilo y 2,3-butanodiol.

El ácido succínico es otro ácido que puede formarse durante la fermentación alcohólica debido a la carboxilación del ácido pirúvico. Además otros ácidos pueden aparecer en la misma ruta de formación de este ácido (Figura 1.43).

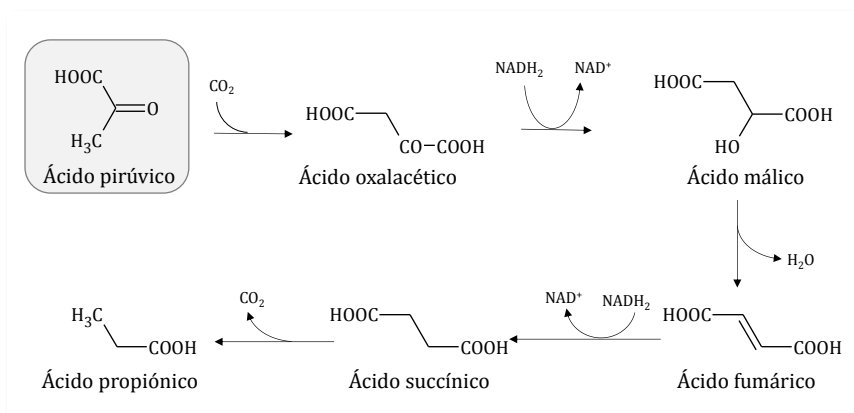


Figura 1.43. Formación de ácidos a partir del ácido pirúvico.

3.4. Factores determinantes del ciclo fermentativo y de las bebidas finales

El desarrollo de la fermentación alcohólica se ve influenciado por diversos factores que se han de controlar para conseguir un producto final de calidad. Algunos de los factores que afectan directamente al proceso de fermentación se explican a continuación.

1. Levaduras

Las levaduras son microorganismos unicelulares simples, que dependiendo del género presentan diferentes formas y tamaños. Normalmente la fermentación es realizada por levaduras *Saccharomyces*. Estas levaduras son capaces de fermentar prácticamente todos los azúcares, excepto los de 5 átomos de carbono. Las levaduras utilizan principalmente en la fermentación, la glucosa y la fructosa. Si hay sacarosa en el medio, producen una enzima, denominada invertasa, que divide la sacarosa en sus dos monómeros.

Durante el proceso fermentativo, las levaduras van disminuyendo, lo que ocurre de igual forma con los azúcares, por lo que a medida que la fermentación avanza, las levaduras van disminuyendo, disminuyendo a su vez, la densidad del zumo/mosto.

2. Temperatura

La temperatura de fermentación no solo afecta al tiempo del proceso y a la concentración final de etanol, sino que puede afectar también a las propiedades organolépticas (Granadillo et al., 2014), a la cantidad de compuestos fenólicos y color de la bebida. Además, es uno de los factores más determinantes, ya que algunas cepas de levaduras tienen un intervalo de actividad bastante reducido. La mayoría de las levaduras se desarrollan y son activas entre los 15 y 30°C. La

temperatura óptima de crecimiento de *S. cerevisiae* es de 25°C, mientras que temperaturas bajas como 13 °C inhiben normalmente el proceso fermentativo y de crecimiento de esta levadura. El rango de temperaturas recomendado para el desarrollo de las levaduras es aquel que no afecta la integridad y funcionalidad de la membrana citoplasmática. Las levaduras crecen a temperaturas por encima del límite superior, provocando la inactivación o desnaturalización de las proteínas de transporte y otras enzimas asociadas a la membrana citoplasmática, mientras que cuando las temperaturas son muy bajas se ve comprometida su fluidez y flexibilidad (Novo et al., 2003). Sin embargo también existen aquellas que trabajan fuera de los límites no comunes, actuando a temperaturas más altas y más bajas. De esta forma se tienen las levaduras termófilas y criófilas. En todo caso, cada levadura en su intervalo térmico óptimo de actividad tiene una velocidad de multiplicación proporcional a la temperatura del medio.

Desde el punto de vista industrial tiene mucha importancia la cantidad de calor que se desprende en la fermentación, ya que a medida que avanza la fermentación el mosto/zumo se va calentando. Puede llegar un momento en que la cantidad de calor que se genera afecte a las levaduras por aumento de la temperatura. Si se sobrepasan los 36-37 °C, las levaduras mueren y la fermentación se para, lo que se denomina parada de fermentación.

3. Aireación

Este factor también es muy importante ya que de él depende el metabolismo y la actividad fermentativa de las levaduras. Cuando hay oxígeno en el medio (condiciones aeróbicas), las levaduras se multiplican más rápidamente cuanto mayor es la cantidad de oxígeno. Sin embargo, en este caso, en lugar de consumir azúcar para producir alcohol, lo hacen para multiplicarse.

La fermentación se produce en anaerobiosis, aunque es necesario pequeñas cantidades de oxígeno para que las levaduras se multipliquen y tengan un desarrollo adecuado. En condiciones anaeróbicas (ausencia de oxígeno), las levaduras se desarrollan difícilmente, pero las que subsisten son capaces de transformar los azúcares del medio en alcohol y dióxido de carbono.

Por tanto, el control de la aireación debe ser un paso controlado en la fermentación para que las levaduras puedan multiplicarse y llevar a cabo a fermentación alcohólica.

4. Acidez

Este factor no presenta una influencia fundamental en la fermentación, pero si se controla se pueden conseguir mejorar algunas características de la bebida final. Por un lado, la acidez del zumo es un freno para las levaduras, pero por otro lado, puede ser útil para inhibir a actividad de bacterias perjudiciales. El pH óptimo para el crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica oscila en el rango de 3 y 5 (Ward et al., 1991).

La acidez suele ser corregida para mejorar las condiciones de fermentación o las propiedades de las bebidas finales. Por ejemplo, el bicarbonato sódico o carbonato sódico, se añade a las bebidas para disminuir la acidez, ya que estos compuestos son capaces de neutralizar algunos ácidos presentes en las mismas. Además, estos compuestos modifican el color de las bebidas que contengan antocianos, ya que

modifican el pH de medio, pero no hacen que disminuya la concentración antocianinas en vinos de arándano usando carbonato cálcico en dosis 0.9-1.8 mg/L (Santos et al., 2016).

5. Presión

Una presión excesiva durante la fermentación alcohólica puede dar lugar al freno de la actividad de las levaduras. De este modo, en mostos de uva en cubas cerradas y con presión de dióxido de carbono, se puede usar esta presión para la conservación de los mismos en cortos periodos de tiempo.

6. Nutrientes

Las levaduras son seres vivos unicelulares. Como todo ser vivo necesita elementos orgánicos y minerales para asegurar su metabolismo. En cuanto a los elementos minerales, no suele haber problema en la composición de los zumos, normalmente no se necesita un suplemento de estos nutrientes. Por ejemplo, las levaduras consumen fundamentalmente fosfatos, que si se aportaran en exceso podrían ser un nutriente para las bacterias, corriendo el riesgo de contaminación bacteriana en el medio.

Por otro lado, un nutriente fundamental para que las levaduras puedan desarrollar y llevar a cabo su función, es el nitrógeno asimilable. Si existiese déficit de nitrógeno, las levaduras necesitarían sintetizarlo a partir de sus propias proteínas. En el caso de los vinos de uva, si existe déficit, se le suele añadir fosfato amónico.

7. Dióxido de azufre

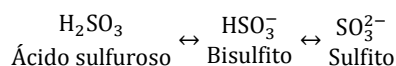
Este compuesto se puede añadir de muchas formas. Normalmente, se añade en forma de gas SO_2 o en sólido $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Ambos compuestos, al pH del vino formarán H_2SO_3 .

El uso correcto de este aditivo hace que se obtengan vinos menos oxidados, con mejor color y aroma, y menor acidez volátil. Este compuesto se usa en los vinos por polivalencia ya que es antioxidante (posee propiedades reductoras), antioxidásico (destruye las oxidasas), antimicrobiano ya que presenta actividad inhibidora sobre levaduras a dosis muy altas; bacterias lácticas y bacterias acéticas, etc. (Garaguso et al., 2015). Por tanto al tener esta última capacidad, hay que tener un uso controlado de este compuesto, para que no afecte mucho a las levaduras.

El dióxido de azufre es capaz de seleccionar entre levaduras y bacterias, en tanto que, en vinos tintos de uva, en dosis normales de vinificación impide el desarrollo de bacterias lácticas permitiendo la proliferación de las levaduras y que puedan desarrollar su actividad fermentativa.

Por otro lado, este compuesto puede reaccionar con los grupos carbonilo dando lugar a compuestos sulfíticos. Por tanto al añadirlo, se reparte en dos fracciones, combinado y libre. El combinado, pierde su actividad al unirse con los azúcares (glucosa y fructosa) y con el acetaldehído.

Por tanto, que haya más o menos aditivo libre, depende de la composición y del pH del medio. El libre suele representar el 10% tras la adición, pero este 10% se encuentra en forma activa, ya que se reparte en tres formas en equilibrio:



La única forma activa es la de ácido sulfuroso, el bisulfito es débilmente activo y el sulfito no es activo. Este equilibrio depende del pH del medio: a pH bajo el equilibrio se desplaza hacia la izquierda. Si el pH es de 3, el 10% libre está como forma activa. Pero si está a 3.8, la forma activa libre es del 1%; el otro 99% está como bisulfito o sulfito.

Sin embargo, el uso de este aditivo puede tener algunos efectos negativos sobre el color y la composición antociánica de las bebidas. A pH 3.2, aproximadamente, el 96% del ácido sulfuroso se encuentra en forma de aniones bisulfito (HSO_3^-), que reaccionan con el catión, haciendo que desaparezca el color proporcionado por los antocianos (He et al., 2012), ya que se produce un desplazamiento crómico y los antocianos dejan de ser rojos pasando a incoloros (Morata et al., 2006). O bien puede que se den reacciones de polimerización, dando lugar a compuestos resistentes a la decoloración del SO_2 como son los pigmentos poliméricos (Soto Vázquez et al., 2010).

4. El arándano

Los “*berries*” son pequeños frutos carnosos, que se comercializan frescos o en forma procesada (Borges et al., 2010). En las últimas décadas, se ha incrementado el interés por el uso de estos frutos y sus derivados debido a los beneficios que presentan para la salud (Müller et al., 2012), ya que son fuente de antioxidantes para la dieta (Borges et al., 2010). Dentro de ellos, se encuentra el arándano que ha sido objeto de estudio de numerosos autores (Costa et al., 2018; Rios de Souza et al., 2014; Seeram., 2008; Borges et al., 2010; Ferguson et al., 2018; Behrends et al., 2017; Martin-Gomez et al., 2017).

El consumo de arándanos ha aumentado con los años, siendo consumidos como fruta fresca o congelada, panadería, zumos de frutas, otras bebidas y concentrados, siropes e incluso como colorante natural alimenticio en algunas partes del mundo (Espín et al., 2000; Eck et al., 1988). Sin embargo, el arándano sigue siendo un cultivo de temporada, y su procesamiento y almacenamiento son etapas muy importantes para mantener los beneficios y disponibilidad de los mismos durante todo el año, debido a la gran posibilidad de que se pierdan compuestos polifenólicos (Yang et al., 1985).

4.1. Situación actual del arándano en España

Hoy en día, los arándanos azules o “*blueberries*” son cultivados en Norte América (mayor productor, exportador y consumidor del mundo), China (Wang et al., 2010), Europa y otras ciudades del hemisferio sur como Chile, Argentina, Uruguay, África, Nueva Zelanda y Australia (Lohachoompol et al., 2008). En Europa los principales países productores de arándanos son Polonia, Alemania, España, Francia, Italia, Reino Unido, Países Bajos y Portugal.

Actualmente en España está aumentando el cultivo y el consumo de arándanos. Dentro de España, Huelva es la provincia con mayor producción de arándano y es la mayor zona productora de Europa para cosecha temprana de primavera, seguida de Asturias, Galicia, Cantabria, País Vasco, Extremadura, Segovia y Salamanca, zonas en la que predominan las cosechas de verano-otoño (Ciordia-Ara et al., 2007). El hecho de que se cultiven arándanos de cosecha temprana, hace que la venta de este producto sea más rentable, ya que la exportación de este fruto es mayor cuando los demás países no pueden producirlo debido al clima.

En la temporada 2017/2018, se destinaron 3.000 hectáreas aproximadamente al cultivo de este fruto. Desde el año 2013 hasta 2017 la superficie de arándano cultivada en Huelva ha crecido entre un 27 y un 33%. España es el tercer país productor, detrás de Alemania y Polonia y aproximadamente el 96% de las exportaciones de arándano son para la Unión Europea. El 4% restante, se destinan a otros países como es Suiza. En los últimos años se observa un interés creciente en países de Oriente Próximo, como Emiratos Árabes Unidos, y áreas del Lejano Oriente como Hong Kong, Malasia y Singapur. (Datos: IV Jornadas del arándano 2018).

4.2. Tipos de arándanos

Primitivamente, todas las variedades de arándanos eran silvestres. Sin embargo, se han ido modificando genéticamente para mejorarlas y conseguir una mayor calidad de estos frutos para su cultivo.

Los arándanos pertenecen a la familia “*Ericaceae*” subfamilia “*Vacciniaceae*,” género “*Vaccinium*,” and subgénero “*Cyanococcus*” (Gough 1994; Routray and Orsat, 2011). El género “*Vaccinium*,” incluye algunos “*berries*” populares consumidos en todo el mundo como son árandanos azules americanos (“*blueberries*”), arándanos rojos americanos (“*cranberries*”), arándano rojo europeo (“*lingonberries*”), arándanos europeos (“*bilberries*”) y otros tipos de arándanos (“*huckleberries*”), (Routray and Orsat, 2011).

Los arándanos que pertenecen al género “*Ericaceae*” pueden ser clasificados como silvestres o cultivados (Lee et al., 2004). En España, principalmente existen tres variedades de arándanos silvestres:

- Arándano común (*Vaccinium Myrtillus* sp.)
- Arándano negro (*Vaccinium uliginosum* sp.)
- Arándano rojo (*Vaccinium vitis-idaea* sp.)

El arándano azul *Vaccinium* es una fruta nativa del Norte de América y Europa y está extensamente cultivada y comercializada (Reque et al., 2014). El género *Vaccinium* lo constituye unas 30 especies y sólo un pequeño grupo de ellas tiene importancia comercial. En España, destacan *V. corymbosum* L., que representa aproximadamente el 80% del total de la superficie cultivada, seguido en importancia por *V. ashei* Reade conocida también como *Rabbiteye*, con un 15% aproximadamente. Entre el 5% restante destacan *V. angustifolium* Aiton y algunos híbridos de *V. angustifolium* y *V. corymbosum* (Serida). En los últimos años, se ha avanzado mucho en la mejora tradicional de los arándanos “*highbush*” y “*rabbiteye*” cultivados desde su domesticación a principios del siglo XX (Rowland et al., 2012)



En los países de Europa existe una versión de arándanos azules conocidos como “*bilberries*” (*Vaccinium myrtillus* L.) la cual pertenece al mismo género que los arándanos “*lowbush*” de Norte América (Routray and Orsat, 2011). La especie silvestre que se puede encontrar con más frecuencia en España es *V. myrtillus* L., distribuyéndose por la Cornisa Cantábrica, Gredos, Guadarrama, y Pirineos Catalán y Aragónés (Ciordia-Ara et al., 2007).



Actualmente, los arándanos que se cultivan en Europa proceden mayoritariamente de plantas silvestres mejoradas de la especie *Vaccinium corymbosum* L. o arándano gigante americano, seguida de otras variedades menos importantes como con *V. vitis-idaea* y *V. macrocarpon* (Ciordia-Ara et al., 2007)

Los arándanos según procedan de cultivo en arbusto alto o bajo se clasifican en: “*highbush*” o “*lowbush*” respectivamente. Dentro de los arándanos tipo “*highbush*” se encuentra la especie *V. corymbosum* L. y *V. ashei* Reade (*Rabbiteye*) y en la clasificación “*lowbush*” se encuentran principalmente los arándanos silvestres.



Además, según el requerimiento de horas de frío para el cultivo de arándanos se pueden clasificar en “*southern*” o “*northern*”. Los arándanos *V. corymbosum* L. se clasifican en “*northernighbush*” o gigantes del Norte si requieren 800 o más horas de frío y los “*southernighbush*” o gigantes del sur con bajos requerimientos de horas de frío (500-300 horas/frío). En concreto, las variedades de la especie *V. ashei* y sus híbridos son agrupados con el nombre genérico de *rabbiteyes*, y son variedades con requerimientos medios en horas-frío (400-600 h/f).

5. Vinos de fruta

La Asociación de Productores de Sidra y Vinos de Frutas de la Comunidad Económica Europea (CEE) define los vinos de frutas de la siguiente manera:

“Vino de fruta: bebida alcohólica obtenida por la fermentación parcial o completa de jugos de frutas frescos, jugo concentrado o reconstituido; o macerado de pulpa con la adición de agua, azúcar o miel. Finalizada la fermentación se puede adicionar jugo fresco, concentrado o reconstituido”.

“Los vinos de frutas tendrán una concentración alcohólica comprendida entre 8 y 14 % (gramos/100 mL). Pueden ser sin carbonatar o carbonatados por la inyección de CO₂ o por fermentación secundaria” (Jarvis, 1996).

Es por ello, que en este estudio, se le puede denominar a las bebidas obtenidas **«vinos de arándano»**. La escasa disponibilidad de datos sobre la tecnología de elaboración y las características fisicoquímicas y sensoriales del vino de arándano imposibilita la comparación de los resultados obtenidos con productos similares; por lo cual se hizo necesario adaptar las prácticas enológicas y comparar los resultados del producto elaborado, principalmente con vinos de uva de los cuales existe muchísima bibliografía; y con vinos de otras frutas como puede ser de mora, fresa, etc.

Cuando se hace referencia a vino, la sociedad tiene asociado que se trata de vino obtenido exclusivamente mediante fermentación de mosto de uva. Este hecho puede ser debido a que probablemente la uva, es la fruta que presenta mejores características químicas, en cuanto a composición de azúcar, ácidos o sales, para la obtención de un vino de calidad; y a que las condiciones climáticas para el cultivo de la uva son más que adecuadas en nuestro país. Sin embargo, en el mundo, se obtienen vinos de otras frutas, controlando los parámetros anteriores si hiciese falta para lograr obtener vinos elaborados con otras frutas. La producción de vinos de frutas distintas de la uva es popular en países del norte europeo, como son Polonia, Rusia y Alemania, donde las condiciones climáticas impiden el desarrollo de la vitivinicultura. También en Gran Bretaña sólo una pequeña cantidad es producida a escala comercial, pero es muy común la elaboración artesanal de vinos de frutas.

Dependiendo del clima y de la producción de frutas de cada punto del mundo, se obtienen diferentes tipos de vinos de frutas. Por ejemplo, en Hawái, Nigeria o Japón se comercializa vino de piña. En algunas zonas del norte, donde las temperaturas son más bajas, producen vino de grosella. Además, en Dinamarca es típico el vino de cereza, el cual se exporta a otros muchos países de Europa y también de América del Norte. En Inglaterra se produce vino de fresa y de frambuesa. En Minnesota, se comercializan vinos de manzana, melocotón, manzana y arándano azul, manzana y arándano rojo y manzana y frambuesa. En Indonesia, se produce vino de la fruta del dragón o pitaya y en Grecia, vino de kiwi.



En España, en las Islas Canarias, parte de la producción del plátano de canarias, se utiliza para la obtención de dos tipos de vinos: un afruitado y un semiseco. Esta

idea surge debido a que se generan miles de toneladas de plátanos que no son aptos para ser comercializados. Algunas de las causas por las que no son aptos son: daños superficiales en su cáscara, tamaño inadecuado o dedos sueltos que sobran de la selección para la producción de manillas de 5 plátanos. Estos vinos se obtienen mediante fermentación alcohólica de plátanos de Canarias, mediante un proceso de elaboración similar al que se realiza para el vino de uva. Para ello, se eliminan las cáscaras de los plátanos para preparar un licuado de la fruta, el cual se fermenta a baja temperatura y posteriormente se filtra. De esta forma se obtiene un vino blanco de plátano de unos 12.5 % v/v.



En Tenerife, también se producen otros tipos de bebidas alcohólicas, utilizando mezclas de frutas, como por ejemplo, plátano de canarias y mora o bien plátano de canarias y maracuyá.

De forma tradicional en Taganana (Tenerife), se produce de forma artesanal, vino de mora. Este vino se obtenía hace más de 20 años, ya que se tenía como una bebida con acciones curativas. Para la elaboración del mismo, las moras maduras se prensan, se añade azúcar al zumo obtenido y se deja fermentar unos 10-12 días.

En cuanto a vinos de arándano, no están muy extendidos en el mundo. México fue el primer productor de este vino, debido también a la excedencia de este tipo de fruto. Actualmente, en Chile se produce vino de arándano y vino de arándano espumoso. En Florida, se produce también vino de arándano e incluso vino dulce de arándano.

Debido a las propiedades beneficiosas para la salud que presentan, los arándanos, cada vez son procesados en más lugares del mundo. Un ejemplo de ello es China, dónde este fruto era poco consumido, pero actualmente el cultivo del arándano es cada vez mayor y parte de esa producción se destina al vino de arándano.



MÉTODOS EXPERIMENTALES

1. Determinaciones generales

Redondez del fruto

La redondez se define como la relación ancho/alto. Estas medidas de alto y ancho se realizan con un calibre.

Grado Brix

El grado Brix de los mostos se mide con un refractómetro modelo Master-Baumé (Atago Co, LTD Tokio, Japón).

pH

La determinación de pH se realiza por media directa con un pH-metro Crison modelo micropH 2001, calibrado con disoluciones tampón de pH 7.02, 4.00 y 9.21 a 25°C.

Acidez volátil

La acidez volátil se define como el conjunto de los ácidos de cadena corta presentes en el zumo/vino, excluyendo los ácidos láctico, succínico, carbónico y el dióxido de azufre. Esta determinación se realiza por arrastre de los ácidos volátiles con vapor de H₂O, rectificación de los vapores y posterior valoración de los mismos, según el método de la OIV (2005). Para ello, una muestra de 20 mL de zumo/vino, al que previamente se ha eliminado el CO₂ mediante agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente, se acidifica con 5 mL de una disolución de 100 g/L de ácido tartárico y se procede al arrastre de los ácidos volátiles, hasta recoger aproximadamente 200 mL de destilado, que se valora con una disolución de hidróxido sódico 0.1 N, con fenolftaleína como indicador. El resultado se corrige restándole la interferencia del SO₂. Para ello se procede, en primer lugar, a la valoración del SO₂ libre con yodo 0.01 N y almidón como indicador tras la acidificación con unas gotas de HCl puro y la adición de un cristal de yoduro potásico. Posteriormente, se valora el SO₂ combinado con yodo 0.01 N tras la adición de 20 mL de disolución de bórax al destilado. Finalmente, la acidez volátil se expresa como meq/L de ácido acético.

Azúcares reductores

Se utiliza el método de Luff-Schoorl (Comunidad Europea, 1990), basado en la reducción del Cu⁺² de una disolución alcalina, por los azúcares reductores contenidos en la muestra (principalmente glucosa y fructosa). Para ello, se toman 10 mL de una muestra diluida 1:10 de zumo/vino defecada con Carretz I y Carretz II (disoluciones de ferrocianuro potásico y sulfato de cinc, respectivamente). Se añaden 25 mL de reactivo Luff-Schoorl (disolución cúprico-alcalina), y se lleva a ebullición a reflujo durante 10 minutos y posteriormente se enfría hasta temperatura ambiente sin agitación, para evitar la oxidación del precipitado de Cu₂O formado. Tras añadir 10 mL de KI al 30% y 25 mL de H₂SO₄ 6 N para reducir el exceso de Cu⁺², el I₂ formado por la acción del Cu⁺² se valora con una disolución de Na₂S₂O₃ 0.1 N usando almidón como indicador. Se cuantifican los azúcares mediante la diferencia del volumen de Na₂S₂O₃ consumido por un blanco y por la muestra, y utilizando datos tabulados.

Etanol

Para la cuantificación de etanol se utiliza el método de Crowell and Ough (1979), basado en la oxidación del etanol, aislado por arrastre con vapor de agua, con dicromato potásico. Para ello, se procede a la destilación de 5 mL de vino con corriente de vapor de agua hasta recoger 60-70 mL. Después de equilibrar la temperatura a 20 °C, se enrasa a 100 mL, de los cuales 2 mL se hacen reaccionar con 10 mL de una disolución de dicromato potásico (34 g/L). Tras 20 minutos de reacción a 60 °C, se baja la temperatura a 20 °C y se mide la absorbancia a 600 nm, frente a un blanco preparado de igual manera, en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Se ha realizado una recta de calibrado con patrones de etanol de 0, 2, 5, 10, 12, 15 y 20% v/v que se muestra a continuación:

$$\text{Etanol (\% v/v)} = 16.834(\Delta A_{600}) - 0.265 \quad R^2 = 0.9996$$

2. Determinaciones espectrofotométricas

Color

Extractos de caracterización de variedades y vinos: Para la medida de las absorbancias 420, 520 y 620 nm se utilizan cubetas de cuarzo 1 mm de paso óptico, corrigiendo posteriormente los resultados para un paso de luz de 1 cm. Las medidas espectrofotométricas se realizan en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25, tras filtración por papel HA-0.45 µm (Millipore).

Extractos de valorización de residuos de zumos de arándano: Las absorbancias a 420 y 520 nm se miden con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Japan). La medida de estas absorbancias se realizó con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Las muestras fueron filtradas por 0.45 micras antes de la medida. El color se midió con un espectrofotómetro Konica Minolta CM-3600d (Japan) y los parámetros L*, a* y b* se obtienen con el software Spectramagic NX CM-S100W, usando como iluminante D65. Las cubetas de cuarzo que utilizadas son de 5 cm de ancho y 1 cm de paso de luz.

Intensidad colorante y tonalidad

Se obtiene la intensidad colorante como suma de las correspondientes absorbancias medidas a 420, 520 y 620 nm. La tonalidad se define como la relación entre las absorbancias medidas a 420 y 520 nm.

Color de pigmentos poliméricos

El color de pigmentos poliméricos (PPC) se obtiene mediante la absorbancia a 520 nm de 5 mL de muestra después de añadir 15 mg de Na₂S₂O₅ y transcurridos 45 min a 25 °C tras la adición. Los antocianos monómeros son inmediatamente decolorados por la adición de Na₂S₂O₅ en exceso al pH del zumo/vino, por lo que el color residual después del tratamiento se debe a las formas poliméricas de estos pigmentos (Somers and Evans, 1977).

Compuestos fenólicos totales

El contenido total de compuestos fenólicos se obtiene con el método de Folin Ciocalteu con algunas modificaciones. 1.250 mL de reactivo de Folin Ciocalteu

diluido 1:5 en agua destilada, se le añaden a 50 μL de extracto filtrado por 0.45 μm . Tras una vigorosa agitación y reposo de 1 minuto a temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$), se añade 1 mL de carbonato sódico al 10%. La mezcla se agita de nuevo y se deja reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras este tiempo, se mide la absorbancia a 760 nm usando un UV-vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Japan). Se realiza una curva de calibrado de ácido gálico usando diferentes concentraciones de estándar del patrón (1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 and 0.01 mg ácido gálico/mL).

$$TPC = 0.4357 (\text{absorbancia } 760 \text{ nm}) - 0.0173 \quad R^2=0.9977$$

Taninos totales

Los taninos del vino están constituidos por cadenas de flavanoles (proantocianidinas) más o menos polimerizadas. Su concentración se determina mediante la reacción de Bate-Smith, basada en un calentamiento en medio ácido que conduce a la ruptura de los enlaces interflavanos de estas estructuras y a la formación de carbocationes que se transforman parcialmente en antocianidinas si el medio es lo suficientemente oxidante (Ribéreau-Gayon and Stonestreet, 1966). Se toman 2 mL de zumo/vino diluido 1:50 y se añade 1 mL de agua destilada y 6 mL de HCl 12N. Tras cerrar herméticamente y proteger de la luz, se calienta al baño maría durante 30 min, se enfría rápidamente hasta temperatura ambiente y se añade 1 mL de etanol. Tras homogeneizar la mezcla, se mide la absorbancia a 550 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz, corrigiendo este valor de absorbancia con el correspondiente de un ensayo en blanco sin calentamiento. Los taninos totales, en g/L, se calculan según la ecuación:

$$\text{Taninos totales (g/L)} = (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}) \times 19.33$$

La constante 19.33 corresponde al coeficiente de extinción molar de la cianidina obtenida por la hidrólisis ácida de una disolución de procianidinas oligómeras de referencia (Ribéreau-Gayon et al., 1998).

Actividad antioxidante

Extractos de caracterización de variedades de arándanos, zumos iniciales y vinos: Para la medida de la actividad antioxidante de los zumos y vinos se utiliza el ensayo DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazilo) de acuerdo al método usado por Alen-Ruiz et al. (2009). Para ello, se prepara diariamente una disolución de DPPH de concentración 45 mg/L en metanol, almacenándola en un frasco opaco durante su utilización y se utiliza como estándar una disolución de 80 mg/L de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico), un análogo de la vitamina E.

Las muestras se diluyen 10 veces previamente a su análisis, con una disolución de etanol 12% en agua, de las cuales se toman alícuotas de 200 μL que se añaden en cubetas de 1cm de paso óptico, que contienen 3 mL de la disolución de DPPH 45 mg/L en metanol. Paralelamente se prepara un blanco (200 μL de muestra diluida en 3 mL de metanol), un control (200 μL de etanol 12% en agua en 3 mL de la disolución de DPPH) y un estándar (200 μL de la disolución de Trolox en 3 mL de la disolución de DPPH). Se mide la absorbancia a 517 nm, del control y del blanco a temperatura ambiente, y tras 10 minutos de incubación, se mide la absorbancia a la misma longitud de onda del estándar y de la muestra.

Los resultados, expresados en mmoles de Trolox equivalentes (mmol TE) por litro, se calculan de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$A_{\text{muestra}} = A_{\text{muestra (t=120 min)}} - A_{\text{blanco}}$$

$$A_1 = A_{\text{control (t=0)}} - A_{\text{muestra}}$$

$$A_2 = A_{\text{control (t=0)}} - A_{\text{estándar (t=120 min)}}$$

$$AA \text{ (mmol TE/L)} = (0.32 \times A_2 \times \text{factor de dilución}) / A_1$$

Extractos de valorización de residuos de zumos de arándanos: Este método se toma como una forma de comparar qué extracto es más antioxidante que otro, sin usar ningún estándar para expresar un valor de actividad antioxidante.

Se prepara una disolución diaria de DPPH al 2.5% en metanol y se almacena en oscuridad. 100 μ L de muestra diluida se añade a 3.9 mL de disolución de DPPH. Se prepara paralelamente un control (disolución de DPPH). Se agitan vigorosamente y tras 30 minutos de reacción o en el caso del control decoloración a temperatura ambiente y en oscuridad, se realiza las medidas espectrofotométricas en un espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu, Japan) a 517 nm frente a un blanco con metanol.

$$\%AA = 100 - ((A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}) / (A_{\text{control}})) * 100$$

Donde A_{muestra} es la absorbancia de la muestra, A_{blanco} es la absorbancia del blanco (metanol puro) y A_{control} es la absorbancia del control (disolución de DPPH en metanol). A partir de estos datos, usando la relación lineal entre las concentraciones de los extractos usados y el %AA obtenido para cada concentración de extracto, se calcula el IC50, es decir, la concentración de extracto necesaria para inhibir el 50% de DPPH en cada caso.

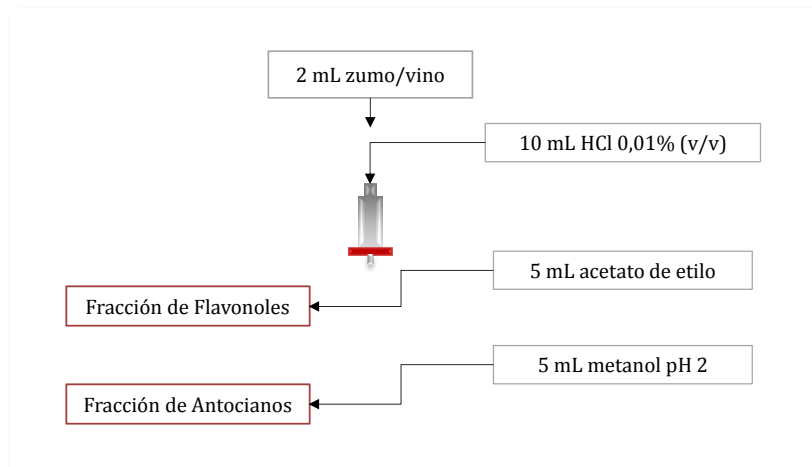
3. Determinación de compuestos bioactivos

Extracción en fase sólida de antocianos y flavonoles

Para la separación de estas familias de compuestos fenólicos se lleva a cabo una extracción en fase sólida, SPE, de acuerdo con el esquema que se muestra, utilizando cartuchos Sep-Pak C₁₈, con 900 mg de relleno (Long Body Sep-Pak Plus; Waters Associates, Milford, MA) para asegurar una completa retención de todos los compuestos fenólicos. Los cartuchos se activan con 5 mL de metanol y se acondicionan con agua destilada a pH 7.0.

Para ello, un volumen de 2 mL de zumo/vino se pasa por un cartucho Sep-Pak C₁₈ previamente activado con 5 mL de metanol y acondicionado con HCl 0.01% (v/v) en H₂O. Tras pasar la muestra de zumo/vino, el cartucho se lava con 10 mL de HCl 0.01% (v/v) en H₂O y 5 mL de acetato de etilo. En esta fracción de acetato de etilo se recogen los flavonoles. Esta fracción se evapora a sequedad y se disuelve en 1 mL de metanol. Tras esto, se eluye la fracción de antocianos con 5 mL de metanol a pH 2.0 según el método descrito por Chinnici et al. (2009). La fracción de antocianos se evapora a sequedad y su volumen se ajusta a 1 mL con metanol pH

2.0. Todas las fracciones se pasaron por filtros de nylon de 0.45 μm antes de su inyección en HPLC.



En el caso de los extractos utilizados para la valorización de residuos y de caracterización de arándanos la inyección fue directa, no se llevó a cabo extracción en fase sólida.

Identificación y análisis de antocianos y flavonoles por HPLC

Extractos, zumos y vinos:

La identificación y cuantificación de antocianos y flavonoles se lleva a cabo en un cromatógrafo de líquidos (Spectra-Physics UV6000LP) con una columna LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μm de tamaño de partícula). Como fase móvil se utiliza ácido fórmico al 10% en agua (disolvente A) y acetonitrilo/agua/ácido fórmico (45:45:10) (disolvente B), con un flujo de 1 mL/min.

La identificación se realiza por comparación de los correspondientes tiempos de retención, así como de los espectros UV-Vis obtenidos por un sistema de detección Diodo-Array, con patrones estándar. Dicha identificación ha sido confirmada por HPLC/ESI-MS (espectrómetro de masas cuadrupolo ThermoQuest Finnigan AQA), operando en modos negativo y positivo. El voltaje de spray de iones fue -4000 V y el voltaje de entrada, -60 V. Los datos de masa se adquieren en dos modos diferentes, modo scan (mediante scanning de m/z en el rango 150-1066 a intervalos de 1.2) y modo de ion múltiple (usando rangos de masas cercanos a los valores específicos m/z).

Los programas de elución utilizados para las fracciones de antocianos y flavonoles, así como la longitud de onda de detección se muestran a continuación:

Fracción	λ (nm)	Tiempo (min)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)
Flavonoles	360	0	95	5
		5	70	30
		19	60	40
		30	20	80
		31	0	100
		35	0	100
		36	95	5
Antocianos	520	0	85	15
		17	70	30
		45	27	73
		48	0	100
		50	85	15

Extractos de valorización de residuos de zumo de arándano:

Antocianinas: La cuantificación de los antocianos a los 60 minutos del proceso de extracción se lleva a cabo en un HPLC (Agilent 1100, France) equipado con un detector de diodos array (DAD). La columna utilizada fue una C₁₈ (5 μ m, 4.6 \times 250 mm, Zorbax SB, Agilent Technologies, France). La fase móvil está compuesta por dos disolventes: (A) 91.5% agua y 8.5% ácido fórmico (v/v) y (B) 43.7% agua, 23.7% metanol, 23.7% acetonitrilo y 8.9% ácido fórmico (v/v/v/v). El programa de elución utilizado se muestra en la siguiente tabla:

Tiempo (min)	%A	%B
0	93	7
35	25	75
45	35	65
46	0	100
50	0	100

El flujo utilizado es de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 μ L. Los compuestos fueron cuantificados utilizando una longitud de onda de 535 nm y mediante una calibración externa con estándares de cada uno de los antocianos identificados realizada por la empresa Naturex. El contenido total de antocianos se expresa en mg/100 g de materia seca (mg/100 g m.s.).

Flavonoles: La cuantificación de los flavonoles a los 60 minutos del proceso de extracción se lleva a cabo en un HPLC (Agilent 1200, France) equipado con un detector de diodos array (DAD). La columna utilizada fue una C₁₈ (5 μ m, 4.6 \times 250 mm, ACE, Advanced Chromatography Technologies, Scotland) conectada a una segunda columna T3 (5 μ m, 4.6 \times 150 mm, Atlantis, Waters, France) con un capilar (0.17 mm \times 9 cm). La fase móvil está compuesta por dos disolventes: (A) acetonitrilo 100% y (B) 99.5% agua con 0.05% de ácido fosfórico (v/v). El programa de elución utilizado se muestra en la siguiente tabla:

Tiempo (min)	%A	%B
0	10	90
30	30	70
45	40	60
51	100	0
60	100	0

El flujo utilizado fue de 1.2 mL/min y el volumen de inyección fue de 5 μ L. Los compuestos fueron cuantificados utilizando una longitud de onda de 365.8 nm y mediante una calibración realizada por la empresa Naturex (Avignon, Francia). El contenido total de flavonoles se expresa en mg quercetina/100 g de materia seca (mg quercetina/100 g m.s.).

Identificación y análisis de derivados de Flavan-3-ol y t-resveratrol

Para la identificación y cuantificación de los derivados de flavan-3-ol, las muestras se diluyeron 20 veces con agua. En el caso del resveratrol que sólo se pudo identificar y cuantificar en los extractos de caracterización de variedades, los extractos se concentraron 5 veces, evaporando a sequedad el extracto y disolviéndolo en 1 mL de metanol.

La identificación y cuantificación se realiza en un HPLC (Thermo Spectra Physic Series P100) con detector de fluorescencia (Perkin Elmer Series 200a), usando una columna LiChrospher 100 RP-18 (250 mm long x 4.6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula). Los disolventes utilizados como fase móvil, son acetonitrilo (disolvente A) y ácido acético al 5% (disolución B) con un flujo de 1.4 mL/min y se sigue el programa de elución siguiente:

Tiempo (min)	%A	%B
0	9	91
22	25	75
30	100	0
32	100	0
35	9	91
40	9	91

Para los derivados de flavan-3-ol, se usan λ_{exc} =280 nm and λ_{em} =320 nm y para el resveratrol λ_{exc} =324 nm y λ_{em} =370 nm.

Cuantificación de compuestos fenólicos

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se compara el área de pico obtenido para cada uno de ellos con las rectas de calibrado de patrones comerciales, suministrados por Sigma-Aldrich Chemical Co. (Madrid, España) y Extrasynthese Co. (Genay, Francia), con una pureza del 95-99%. De cada uno de los patrones usados se preparan disoluciones de diferentes concentraciones que

se sometieron al mismo procedimiento de extracción en fase sólida que las muestras y se inyectan en HPLC-DAD-MS con el programa cromatográfico correspondiente. Se construyen las respectivas rectas de calibrado, cuyas ecuaciones y coeficientes de regresión se presentan en la siguiente tabla:

Antocianos de extractos y vinos	Concentración (mg/L)
Delfinidín-3- <i>O</i> -galactósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Cianidín-3- <i>O</i> -galactósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Petunidín-3- <i>O</i> -galactósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Peonidín-3- <i>O</i> -galactósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Malvidín-3- <i>O</i> -galactósido	$y=8E-06x+0.525$ $r=0.9996$ (0-100 mg/L)
Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Cianidín-3- <i>O</i> -arabinósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Cianidina	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Petunidina	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Peonidina	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Malvidina	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido
Peonidín-3-pentósido	Como malvidín-3- <i>O</i> -galactósido

Flavonoles de extractos y vinos	Concentración (mg/L)
Quercetín-3- <i>O</i> -glucósido	$y=1E-05x+0.2092$ $r=0.9999$ (0-100 mg/L)
Quercetín-3- <i>O</i> -glucurónido	Como quercetín-3- <i>O</i> -glucósido
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	$y=1E-05x-1.1075$ $r=0.9998$ (0-100 mg/L)
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucurónido	Como kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido

Derivados de Flavan-3-ol de extractos y vinos	Concentración (mg/L)
(+)-Catequina	$y=59582x-11735$ $r=0.9999$ (0-100 mg/L)
(-)-Epicatequina	$y=56424x+54.7$ $r=0.9999$ (0-200 mg/L)
Procianidina B1	Como (+)-catequina
Procianidina B2	Como (+)-catequina
Epigallocatequín-3- <i>O</i> -galato	$y=107832x-14218$ $r=0.9999$ (0-100 mg/L)
Epigallocatequina	Como epigallocatequín-3- <i>O</i> -galato

Resveratrol de extractos y vinos	Concentración (mg/L)
	$y=5E+6x+104293$ $r=0.9999$ (0-50 mg/L)

Vitamina C

La determinación de la vitamina C se hace en dos pasos según el método descrito por Sawsen et al; 2012, con algunas modificaciones. En uno de ellos se determina el ácido L-ascórbico actual y en el otro se determina ácido L-ascórbico total, para que con la diferencia de ambas concentraciones se obtenga la concentración del ácido dehidroascórbico.

$$\text{Ácido ascórbico total} = \text{Ácido L-ascórbico (Forma reducida)} + \text{Ácido dehidroascórbico (Forma oxidada)}$$

Para la determinación del ácido L-ascórbico total, se añaden 0.7 mL de solución extractora (ácido metafosfórico 4.5%) a 0.1 gramos de liofilizado o en su caso a 0.7 mL de zumo/vino. Se agita vigorosamente la mezcla y se centrifuga 10 minutos a 5000 rpm a 4 °C. A 1 mL del sobrenadante se le añaden 0.2 mL de DTT (DL-dithiotreitol). Esta mezcla se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente durante dos horas para que el ácido dehidroascórbico pase a la forma reducida ácido L-ascórbico. Transcurrido este tiempo se filtra por papel 0.45µm y se inyecta en un HPLC (Thermo Spectra Physics Series P100) con detector UV (Thermo Finnigan Spectra System UV2000), usando una columna LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm tamaño de partícula). La fase móvil que se usa es el tampón KH₂PO₄ (0.2 M, pH = 2.3-2.4, ajustada con ácido ortofosfórico) con un flujo de 1.0 mL/min durante 15 minutos. La longitud de onda usada es λ=243 nm y el volumen de inyección de 20 µL.

Para la determinación del ácido L-ascórbico, a 0.1 gramos de liofilizado o en su caso a 0.7 mL de zumo/vino se le añaden 0.7 mL de solución extractora (ácido metafosfórico 4.5%), se centrifuga 10 minutos a 5000 rpm a 4°C y se inyecta en el HPLC en las mismas condiciones anteriores.

Los valores del área del pico se comparan con una recta de calibración realizada con patrón de ácido L-ascórbico, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración L-ascórbico} = 1E-05x + 6.3535 \quad R^2 = 0.9975$$

4. Análisis sensorial

Para evaluar la calidad de los vinos de arándanos obtenidos en el presente estudio, se realizó un análisis sensorial de los mismos basado en las tres pruebas que se describirán a continuación. Se sometieron a análisis los vinos de fermentación parcial y total elaborados a 17 y 21 grados centígrados.

El jurado estuvo compuesto por 10 catadores, tres de ellos jueces expertos especializados en la cata de vinos de frutas. Previamente a la realización de las pruebas se expuso a los catadores el problema a resolver, disponiendo cada uno de una ficha similar a la que se muestra a continuación.

CATA BEBIDAS FERMENTADAS DE ARÁNDANOS

Nombre:

Fecha:

Prueba 1: Puntúe cada una de estas bebidas por su aroma y sabor.

a) Aroma

	Indeseable		Acceptable		Deseable
221	1	2	3	4	5 6
682	1	2	3	4	5 6
172	1	2	3	4	5 6
334	1	2	3	4	5 6
280	1	2	3	4	5 6
133	1	2	3	4	5 6
025	1	2	3	4	5 6
737	1	2	3	4	5 6
218	1	2	3	4	5 6

b) Sabor

	Indeseable		Acceptable		Deseable
221	1	2	3	4	5 6
682	1	2	3	4	5 6
172	1	2	3	4	5 6
334	1	2	3	4	5 6
280	1	2	3	4	5 6
133	1	2	3	4	5 6
025	1	2	3	4	5 6
737	1	2	3	4	5 6
218	1	2	3	4	5 6

Prueba 2: Puntúe cada una de estas bebidas por su color.

	Indeseable		Acceptable		Deseable
534	1	2	3	4	5 6
098	1	2	3	4	5 6
122	1	2	3	4	5 6
178	1	2	3	4	5 6
220	1	2	3	4	5 6
304	1	2	3	4	5 6
056	1	2	3	4	5 6
889	1	2	3	4	5 6
286	1	2	3	4	5 6

Prueba 3: Examine cada grupo de bebidas fermentadas. Rodee con un círculo la clave del vino que considera distinto. Es indispensable que señale uno de los tres.

Grupo 1		
A	B	C

Grupo 2		
A	B	C

Grupo 3		
A	B	C

Grupo 4		
A	B	C

El análisis sensorial se llevó a cabo en una sala termostatzada a 20 °C, utilizando catavinos homologados según la norma UNE 87022:1992. Durante todo el estudio, los catavinos estuvieron perfectamente señalizados y tapados para evitar la pérdida de propiedades organolépticas de los mismos. Las pruebas se realizaron a media mañana, fuera del horario de las comidas. Las muestras se conservaron a 20°C hasta el momento de su análisis.

Prueba 1 y 2. Evaluación del aroma, sabor y color

Para la prueba de evaluación de aroma y sabor se utilizó el método de escalas, conforme a la norma UNE-ISO 4121:2006 (Análisis sensorial. Directrices para la utilización de escalas de respuestas cuantitativas). Para ello, se utilizó una escala de tres grados y seis puntuaciones: indeseable (1-2), aceptable (3-4) y deseable

(5-6). Los vinos se presentaron en catavinos negros, para evitar que el color de los mismos pudiera influir sobre la puntuación de aroma y sabor.

Por otro lado, la evaluación del color se realizó de acuerdo a la norma anterior, utilizando para ello las mismas puntuaciones de la prueba 1. En este caso, las muestras se presentaron en catavinos transparentes, en distinto orden y con diferente código a la prueba anterior, con el fin de que los catadores no estuviesen predispuestos por los resultados obtenidos antes.

Prueba 3. Prueba triangular

Esta prueba se realizó según la norma UNE-EN ISO 4120:2008 (Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular), donde los catadores fueron preguntados por la similitud entre muestras (encontrar la diferente). En este caso se compararon por parejas los vinos parciales de igual proporción pero elaborados a diferentes temperaturas (17 y 21 grados centígrados) y por otro lado los vinos de fermentación total de igual proporción y elaborados a diferentes temperaturas.

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE VARIEDADES DE ARÁNDANOS CULTIVADAS EN EL SUR DE ESPAÑA

1. Introducción

Los arándanos azules (en inglés “blueberries”) están categorizados dentro de la familia “Ericaceae”, subfamilia “Vacciniaceae”, género “Vaccinium” y subgénero “Cyanococcus” (Routray and Orsat., 2011). El género “Vaccinium” consiste en aproximadamente 450 especies, donde los arándanos azules (*Vaccinium corymbosum* L.) de mata alta o “highbush” (1,5 a 7 metros de altura) son una de las especies *Vaccinium* más cultivadas en el siglo XX (Michalska et al., 2015). Los arándanos azules cultivados procedentes de Norte América fueron introducidos en Andalucía a principios de 1990, no siendo regularmente comercializados hasta finales de 1995 (Molina et al., 2008).

Los arándanos azules cultivados utilizados en este estudio, pertenecen a la variedad *V. corymbosum* L. o gigante americano. Las bayas maduras son grandes y de color negro-azulado, aunque es común que en la piel se tenga una capa blanca cerosa que se denomina pruina. El peso medio de estas bayas oscila entre 1 y 4 gramos y poseen numerosas semillas en la pulpa. El zumo que se obtiene tras el procesamiento de los mismos es aromático e incoloro. Estos frutos se componen de piel más o menos fina, pulpa carnosa y semillas pequeñas como se puede comprobar en la Figura 3.1.

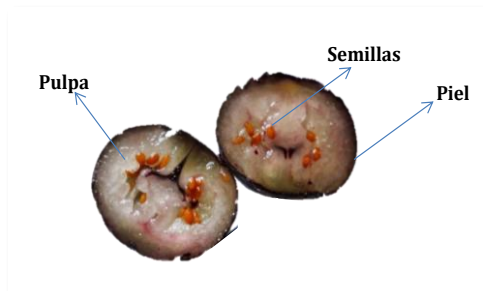


Figura 3.1. Partes de la baya del arándano.

El requerimiento de pH suelo para estos frutos se encuentra entre 4.0 y 5.5; si el valor es superior las concentraciones de microelementos como el hierro y el zinc son deficientes, con lo que la cosecha sería escasa y de poco rendimiento. Además, necesitan un suelo con buen drenaje (Williamson et al., 1994).

Estos frutos necesitan una cierta cantidad de horas de frío (h/f) para romper la “dormancia” o reposo vegetativo invernal. El número de horas requerido dependerá de la genética de cada variedad o especie. Este parámetro es muy importante ya que de él dependerá si se tiene una floración más o menos fértil y/o más o menos abundante. En función del requerimiento de nº horas de frío se distinguen tres grupos agronómicos tal y como se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Grupos agronómicos de arándanos según el requerimiento de número de horas de frío para la maduración.

Nº horas de frío (h/f)	Grupo agronómico
800 o más	Variedades con altos requerimientos en horas-frío.
400-600	Variedades con requerimientos medios de horas-frío.
menos de 500	Variedades con bajos requerimientos de horas-frío.

Como las variedades que se tienen actualmente en España son variedades híbridas de *Vaccinium corymbosum* L., los técnicos han clasificado estos frutos como “*northern highbush*” o “*del norte de arbusto alto*” que necesitan altos requerimientos en horas-frío (800 o más h/f) y los “*southern highbush*” o “*del sur de arbusto alto*” que precisan de bajos requerimientos en h/f (500-300 o menos h/f). Los arándanos utilizados en este estudio son cultivados en el sur de España (Moguer, Huelva) y pertenecen a los “*southern highbush*” (Figura 3.2), es decir, son frutos que requieren menos de 500 horas de horas-frío (Consejería de Desarrollo Rural, Ganadería, Pesca y Biodiversidad., 2011).



Figura 3.2. Árbol del arándano.

El periodo de maduración será diferente, según el lugar de plantación de los arándanos. Por ejemplo, la variedad Windsor se suele recolectar entre mayo y junio en el norte de España (Asturias), y en Andalucía, debido a las condiciones climáticas, esta variedad se recolecta desde marzo hasta junio. Las variedades que se han estudiado, se recolectaron todas en marzo, por tanto son variedades tempranas. Durante el periodo de maduración las bayas van cambiando de color desde el verde hasta el azul-morado, pasando por tonalidades rosas-rojas (Figura 3.3).



Figura 3.3. Arándanos azules cultivados en Huelva en diferentes estados de maduración.

Las variedades utilizadas en este estudio fueron Jewel, Millenia, Star y Windsor (Figura 3.4). Estas variedades fueron patentadas y puestas a la venta por la Universidad de Florida (Williamson et al., 1994).



Figura 3.4. Variedades de arándanos estudiadas

La variedad Jewel se caracteriza por un requerimiento de frío de pocas horas (200 horas). El color de la baya es azul no muy oscuro y de tamaño grande-muy grande y su sabor es agradable. La cicatriz que presenta es media.

Por otro lado, la variedad Millenia, ha demostrado alta adaptabilidad a las zonas de bajas horas de frío (200 horas). Es una variedad muy productiva, su fruto es grande, de cicatriz media y de color azul oscuro. En zonas con muchas horas de calor la baya pierde firmeza.

La variedad Star es la única variedad de arándanos que puede ser reconocida por su aspecto físico ya que presenta forma de estrella en la parte superior. Es una variedad de buena producción, aunque es sensible a la *botrytis*. Las horas de frío

estimadas para esta variedad son 300-400. El color de la baya es azul medio, posee sabor dulce y tiene cicatriz media.

Por último, la variedad Windsor se caracteriza por presentar requerimiento de horas/ frío bajo, al igual que la variedad Star, necesita alrededor de 300-400 horas de frío. Es una variedad muy productiva siendo su baya firme y de gran tamaño. Posee un sabor excelente, un color azul oscuro y es de cicatriz media.

El objetivo de este estudio fue la caracterización físico-química de cuatro variedades de arándanos para conocer las propiedades físicas, composición y concentración de compuestos bioactivos en estos frutos, así como su actividad antioxidante. El segundo objetivo fue el estudio de la composición y concentración de compuestos bioactivos en la piel y en la pulpa del fruto a fin de conocer donde existe la mayor concentración de cada uno de estos compuestos para su utilización en la elaboración de bebidas. Así mismo se pretende elegir la variedad que mejor se adapte al procesado para la obtención de vinos de arándano.

2. Material experimental

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron cuatro variedades de arándanos, Jewel, Millenia, Star y Windsor (*Vaccinium corymbosum* L) de la cosecha de 2014 y recogidas en Moguer (Huelva). Los arándanos de las distintas variedades se recogieron todas en el mes de marzo y en su punto óptimo de maduración comercial (10-12°Brix).

Todas las variedades de arándanos fueron sometidas a un pelado manual para separar la piel de la pulpa. Tanto el fruto entero, como la piel y la pulpa por separado, fueron congelados (-20°C) y posteriormente liofilizados (Figura 3.5).

El liofilizado de cada fracción fue triturado con un triturador (Culatti, DFH 48). Los liofilizados fueron sometidos a extracción asistida con baño de ultrasonidos (Ultrasons, P Selecta, Barcelona, España), durante diez minutos, tres veces consecutivas, usando metanol acidificado con ácido clorhídrico 0.1%. El extracto obtenido fue centrifugado (10 minutos, 3000 rpm) y filtrado por filtros de 0.45 micras para su análisis.

Finalmente, el volumen del extracto metanólico recogido fue de aproximadamente 9 mL, los cuales se enrasaron a 10 mL con el mismo extractante, a fin de tener siempre el mismo volumen final de muestra inicial.

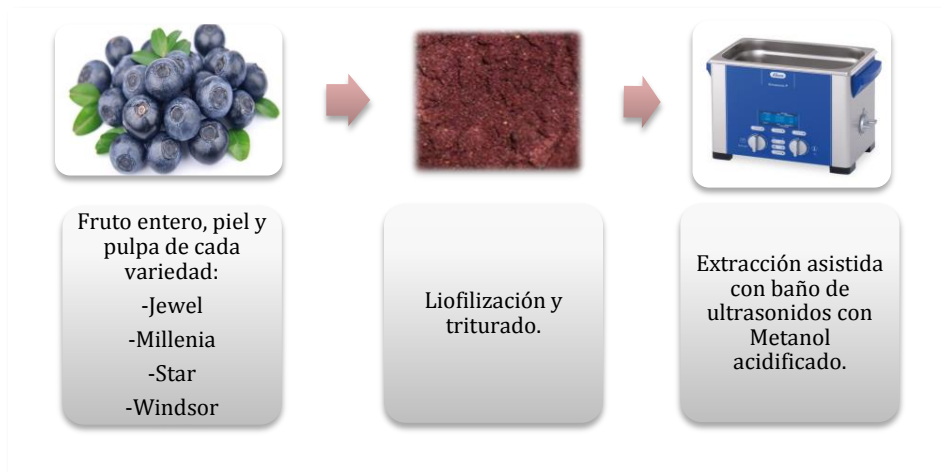


Figura 3.5. Proceso de extracción utilizado para la caracterización de variedades.

3. Resultados y discusión

3.1. Parámetros físico-químicos

Los arándanos son pequeños frutos más o menos redondeados dependiendo de la variedad. Se puede observar en la Tabla 3.2 que el peso medio de cada variedad fue diferente, siendo Star la que mayor peso medio presentó (hasta 2.3 veces mayor que las demás), seguida de la variedad Windsor, Millenia y por último Jewel. Otros autores han encontrado igualmente diferencias significativas entre variedades de arándanos azules con pesos medios comprendidos entre 0.8-3.6 gramos (Che et al., 2009; Kim et al., 2013).

Tabla 3.2. Parámetros físico-químicos (media y desviación estándar) en las variedades de arándanos estudiadas.

		Jewel	Millenia	Star	Windsor
Baya	Peso medio	1.49±0.207	1.83±0.045	3.48± 0.000	2.21±0.148
	°Brix	10.1±0.115	11.3±0.114	11.7±0.115	10.9±0.115
	% H ₂ O baya	86.5	85.9	85.6	85.7
	Redondez	1.18±0.104	1.33±0.082	1.29±0.107	1.31±0.084
Pulpa	% pulpa	93.0	93.0	90.2	92.2
	H ₂ O (g)	65.3	87.5	137	93.2
	% H ₂ O pulpa	89.4	87.6	87.4	87.4
Piel	% piel	7.00	6.96	9.88	7.81
	H ₂ O (g)	14.3	5.78	13.6	7.16
	% H ₂ O piel	77.6	77.4	79.0	79.2

De acuerdo al % de piel y pulpa en cada baya, Jewel y Millenia fueron las variedades que mayor % pulpa obtuvieron y menor % piel, y viceversa para Star y Windsor, donde en el caso de la variedad Star se tiene un 9.88 % de piel y un 7.81% para Windsor.

En lo que refiere a la cantidad de agua en la pulpa de las variedades estudiadas, todas las bayas presentaron un porcentaje similar, si bien, la variedad Jewel, fue la que mayor porcentaje de agua presentó. De igual forma sucedió en la piel, pero en este caso fue la variedad Windsor, la que mayor contenido presentó.

En cuanto al contenido de azúcar (°Brix) de las variedades, no se encontraron diferencias significativas entre ellas, estando esto de acuerdo con los valores de grados Brix encontrados por otros autores (Molina et al., 2008).

Según la forma, las variedades estudiadas no son esféricas. Todas ellas presentan una forma más o menos aplanada correspondiendo su forma con un esferoide. Por esta razón, se midió el diámetro en el ecuador y la distancia entre polos de 50 bayas de cada variedad y se obtuvo la esfericidad de las mismas como la relación entre ambas medidas. La variedad Millenia, Windsor y Star son las variedades más ovaladas, siendo la variedad Jewel algo más esférica respecto a las demás, ya que cuanto más se acerca a 1 la relación entre el ancho y alto, más esférica es la baya.

3.2. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante

3.2.1 Fruto entero

Antocianinas

La composición de compuestos bioactivos depende de la variedad del fruto y de otros factores, como pueden ser, el clima, el suelo de cultivo, punto de maduración, etc. (Routray and Orsat; 2011). En relación a los antocianos de las variedades estudiadas, se encontraron derivados galactosilados, glucosilados y arabinósidos de la delfinidina, malvidina, cianidina, petunidina y peonidina. Además, se determinaron y cuantificaron algunas agliconas y un pentósido de la peonidina. Los compuestos mayoritarios que se encontraron en todas las variedades fueron el delfinidín-3-*O*-galactósido y el malvidín-3-*O*-galactósido, excepto en la variedad Jewel donde los compuestos mayoritarios fueron los derivados glucosilado y galactosilado de la malvidina (Tabla 3.3). Algunos autores han encontrado que el malvidín-3-*O*-galactósido fue el principal antociano en estudios de variedades de arándanos (Wang et al., 2012; Skrede et al., 2000, Zheng et al., 2003, Müller et al., 2012, Varo et al., 2018), mientras que otros encontraron como antociano mayoritario el delfinidín-3-*O*-galactósido (Cho et al., 2004).

Tabla 3.3. Concentración de antocianos (mg/100 g materia seca (m.s.)) (media, desviación estándar y grupos homogéneos) en las variedades de arándanos estudiadas.

	Jewel	Millenia	Star	Windsor
Delfinidín-3- <i>O</i> -galactósido	162±0.306 ^a	214±5.50 ^b	146±4.00 ^c	187±2.90 ^d
Cianidín-3- <i>O</i> -galactósido	n.d.	25.4±3.80 ^a	43.9±0.503 ^b	20.0±3.60 ^a
Petunidín-3- <i>O</i> -galactósido	94.7±0.306 ^a	132±0.503 ^b	79.6±0.800 ^c	120±0.702 ^d
Peonidín-3- <i>O</i> -galactósido	3.15±0.070 ^a	11.6±1.86 ^b	10.5±0.360 ^b	7.09±0.430 ^c
Malvidín-3- <i>O</i> -galactósido	170±1.60 ^a	240±3.50 ^b	115±0.306 ^c	209±1.50 ^d
Total galactósidos	430±2.13^a	623±1.11^b	395±4.36^c	543±1.93^d
Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	120±1.20 ^a	95.7±4.30 ^b	6.98±0.260 ^c	47.9±0.503 ^d
Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	9.41±0.210 ^a	11.1±1.51 ^a	2.33±0.250 ^b	4.25±0.031 ^b
Petunidín-3- <i>O</i> -glucósido	n.d.	n.d.	20.6±1.26 ^a	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido	213±1.70 ^a	184±4.80 ^b	10.9±0.260 ^c	88.5±1.70 ^d
Total glucósidos	342±0.297^a	291±1.01^b	40.8±1.51^c	141±2.18^d
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinósido	140±0.115 ^a	153±5.70 ^b	93.4±0.400 ^c	124±1.27 ^d
Cianidín-3- <i>O</i> -arabinósido	110±1.10 ^a	88.8±0.400 ^b	3.37±0.390 ^c	50.5±0.115 ^d
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinósido	73.7±0.115 ^a	82.3±3.50 ^b	37.7±0.306 ^c	66.8±1.60 ^d
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinósido	121±1.30 ^a	130±2.60 ^b	63.7±0.115 ^c	121±2.20 ^a
Total arabinósidos	445±0.115^a	454±0.115^b	198±0.390^c	362±4.83^d
Peonidín-3-pentósido	1.11±0.163 ^a	0.933±0.031 ^a	1.60±0.174 ^b	1.31±0.192 ^{ab}
Cianidina	n.d.	n.d.	0.47±0.008 ^a	n.d.
Petunidina	n.d.	n.d.	0.26±0.007 ^a	n.d.
Peonidina	n.d.	n.d.	1.40±0.017 ^a	3.82±0.423 ^b
Malvidina	2.44±0.240 ^a	11.6±0.280 ^c	2.93±0.012 ^{ab}	3.31±0.110 ^b
Total Agliconas	2.44±0.240^a	11.6±0.280^b	5.07±0.010^c	7.13±0.324^d
Total antocianinas	1221±2.22^a	1381±1.34^b	640±6.44^c	1054±8.80^d

En todas las variedades se determinó y cuantificó el peonidín-3-pentósido y algunas agliconas, pero en todos los casos, estos compuestos representaron menos de un 1% del total de las antocianinas.

En la variedad Star, se determinaron cuatro agliconas (cianidina, petunidina, peonidina y malvidina), en Windsor se determinaron y cuantificaron dos de las agliconas (peonidina y malvidina), y en Jewel y Millenia sólo la malvidina fue cuantificada.

La Figura 3.6 muestra la concentración de antocianinas agrupadas por familias en las cuatro variedades. Como se puede observar, los galactósidos fueron los derivados mayoritarios en las variedades Millenia, Star y Windsor. El rango de concentraciones para esta familia estuvo entre 395 y 623 g/100 g m.s. En estas variedades, los derivados galactósidos representaron un 45.1, 61.6 y 51.5 % del total de las antocianinas cuantificadas en Millenia, Star y Windsor respectivamente. Por otro lado, los derivados arabinósidos representaron aproximadamente un 30% en las tres variedades (32.9, 30.9 y 34.3% respectivamente). En tercer lugar, se encontró la familia de los glucósidos presentando diferencias entre las variedades en cuanto al porcentaje respecto del total de antocianos, ya que fueron 21.1, 6.37 y 13.4% para las variedades Millenia, Star y Windsor, respectivamente. La variedad Jewel no siguió el mismo patrón de contenido en las diferentes familias. En esta variedad, se encontró que fueron los derivados arabinósidos los mayoritarios seguidos de galactósidos, representando aproximadamente la misma proporción respecto del total de los antocianos en esta variedad (36.5 y 35.2 %, respectivamente). A estas dos familias, les sigue la familia de los glucósidos representando un 28 % del total.

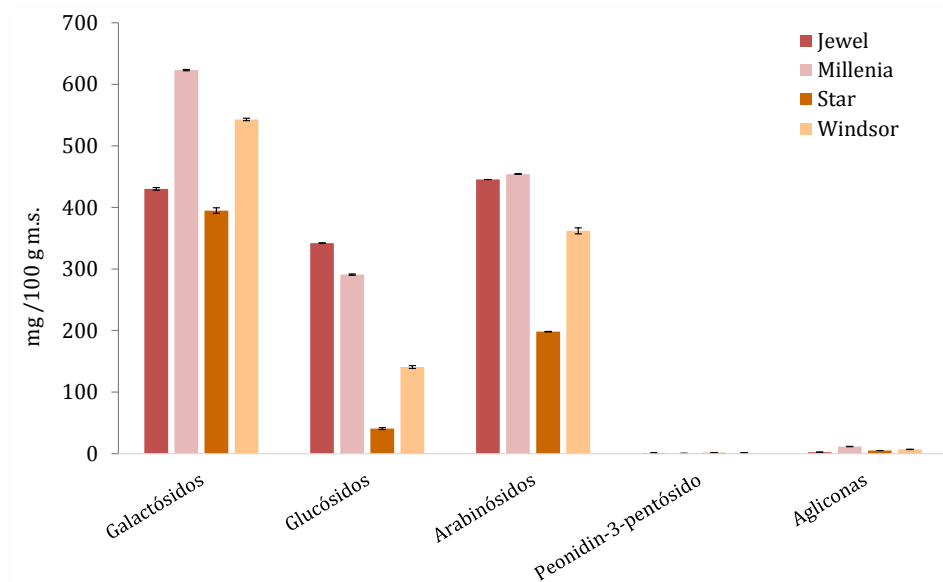


Figura 3.6. Concentración de antocianos agrupados por familias (media y desviación estándar) en las variedades de arándanos estudiadas.

Considerando la concentración total en antocianinas, puede observarse que las variedades en estudio mostraron diferencias significativas (Tabla 3.3). Star fue la

variedad más pobre (640 ± 6.44 mg/100 g m.s.), siendo esta concentración menos de la mitad de la que posee la variedad más rica correspondiente a Millenia (1381 mg/100 g materia seca).

Compuestos derivados de flavan-3-ol

La Tabla 3.4 muestra la concentración de derivados de flavan-3-ol de las cuatro variedades de arándanos estudiadas. Como se puede observar, en las variedades Jewel, Millenia y Windsor, se determinaron y cuantificaron tres monómeros ((+)-catequina, (-)-epicatequina, epigallocatequín-3-*O*-galato) y un dímero, la procianidina B1 (epicatequina-catequina). En la variedad Star se determinó además epigallocatequina.

Tabla 3.4. Concentración de compuestos derivados de flavan-3-ol (mg/100 g m.s.) (media, desviación estándar y grupos homogéneos) en las variedades de arándanos estudiadas.

	Jewel	Millenia	Star	Windsor
Procianidina B1	1.85 ± 0.025^a	0.835 ± 0.071^b	2.66 ± 0.070^c	1.69 ± 0.006^d
(+)-Catequina	12.7 ± 0.239^a	11.4 ± 0.601^a	84.6 ± 1.77^b	25.4 ± 0.234^c
(-)-Epicatequina	2.50 ± 0.007^a	2.38 ± 0.097^a	10.7 ± 0.147^b	4.86 ± 0.038^c
Epigallocatequina	n.d.	n.d.	3.89 ± 0.452^a	n.d.
Epigallocatequín-3- <i>O</i> -galato	15.0 ± 0.973^a	3.31 ± 0.380^b	41.5 ± 0.742^c	5.84 ± 0.074^d
Total derivados de flavan-3-ol	32.1 ± 0.970^a	17.9 ± 0.382^b	143 ± 0.625^c	37.8 ± 0.267^d

El compuesto mayoritario en las variedades Millenia, Star y Windsor fue la (+)-catequina, representando un 62.7, 58.7 y un 67.2%, respectivamente, del total de compuestos derivados de flavan-3-ol. El segundo compuesto mayoritario para estas variedades fue el epigallocatequín-3-*O*-galato, que representó respecto del total un 18.5, 29.0 y un 15.5%. De nuevo, en el caso de la variedad Jewel, hubo diferencias en cuanto al perfil de compuestos mayoritarios en las diferentes variedades. En esta variedad, el compuesto mayoritario fue el epigallocatequín-3-*O*-galato, seguido de (+)-catequina representando un 46.7 y un 39.5 % del total respectivamente. Por otro lado, la procianidina B1, fue el compuesto que se encontró en menor concentración en todas las variedades.

En la Figura 3.7 se muestran las concentraciones totales de compuestos derivados de flavan-3-ol de las cuatro variedades estudiadas. Se puede observar que la variedad Star presentó una concentración total de estos compuestos, aproximadamente 8 veces mayor que la variedad Millenia (17.9 mg/100 g m.s.), lo cual es interesante ya que Star fue la variedad con menores concentraciones de antocianinas. Por el contrario, la variedad Millenia, fue la que mayor concentración de antocianinas presentó y la de menor concentración de compuestos derivados de flavan-3-ol. Ello podría poner de manifiesto que existe una relación directa entre ambos compuestos por lo que podrían estar implicados en las mismas reacciones de biosíntesis.

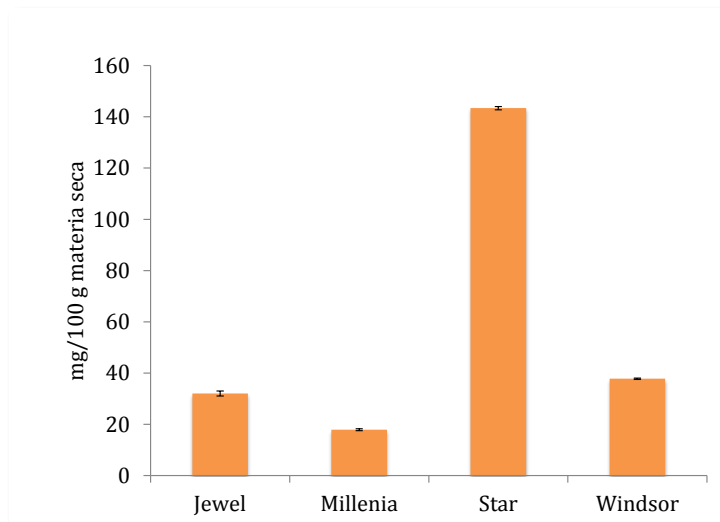


Figura 3.7. Concentración total de compuestos derivados de flavan-3-ol (media y desviación estándar) en las variedades de arándanos estudiadas.

En este sentido, es conocido que la ruta de biosíntesis de compuestos flavonoides está regulada por diferentes genes que han sido identificados en muchas plantas (Winkel-Shirley, 2001), aunque existen otros factores como el clima, el suelo o la práctica de cultivo que pueden afectar a esta ruta (Routray and Orsat; 2011). La Figura 3.8 muestra la ruta de biosíntesis de compuestos flavonoides propuesta por Winkler-Shirley (2001). Estos autores estudiaron que el metabolismo de los compuestos flavonoides comienza con el metabolismo general de los fenilpropanoides. Estos compuestos pueden conducir a diferentes subgrupos de flavonoides, como las chalconas, isoflavonoides, flavonas, flavonoles y flavanoles, antocianinas y taninos condensados. En particular, estos autores demostraron que los derivados de antocianinas y los derivados de flavan-3-ol forman parte de la vía de síntesis. La síntesis de flavonoides comienza a partir de fenilpropanoides y malonil-CoA para formar los flavan-3,4-dioles. A partir de estos compuestos, la vía se divide en dos rutas, por una parte puede dar lugar a una reducción para formar flavan-3-oles a través de la enzima leucoantocianidina reductasa (LCR), o por otra parte, puede ocurrir una reacción de oxidación catalizada por la enzima leucoantocianidina dioxigenasa, para posteriormente formar antocianinas. Por lo que podría pensarse que a igualdad en las condiciones de cultivo, el factor más influyente en la síntesis de flavonoides debe ser el factor genético.

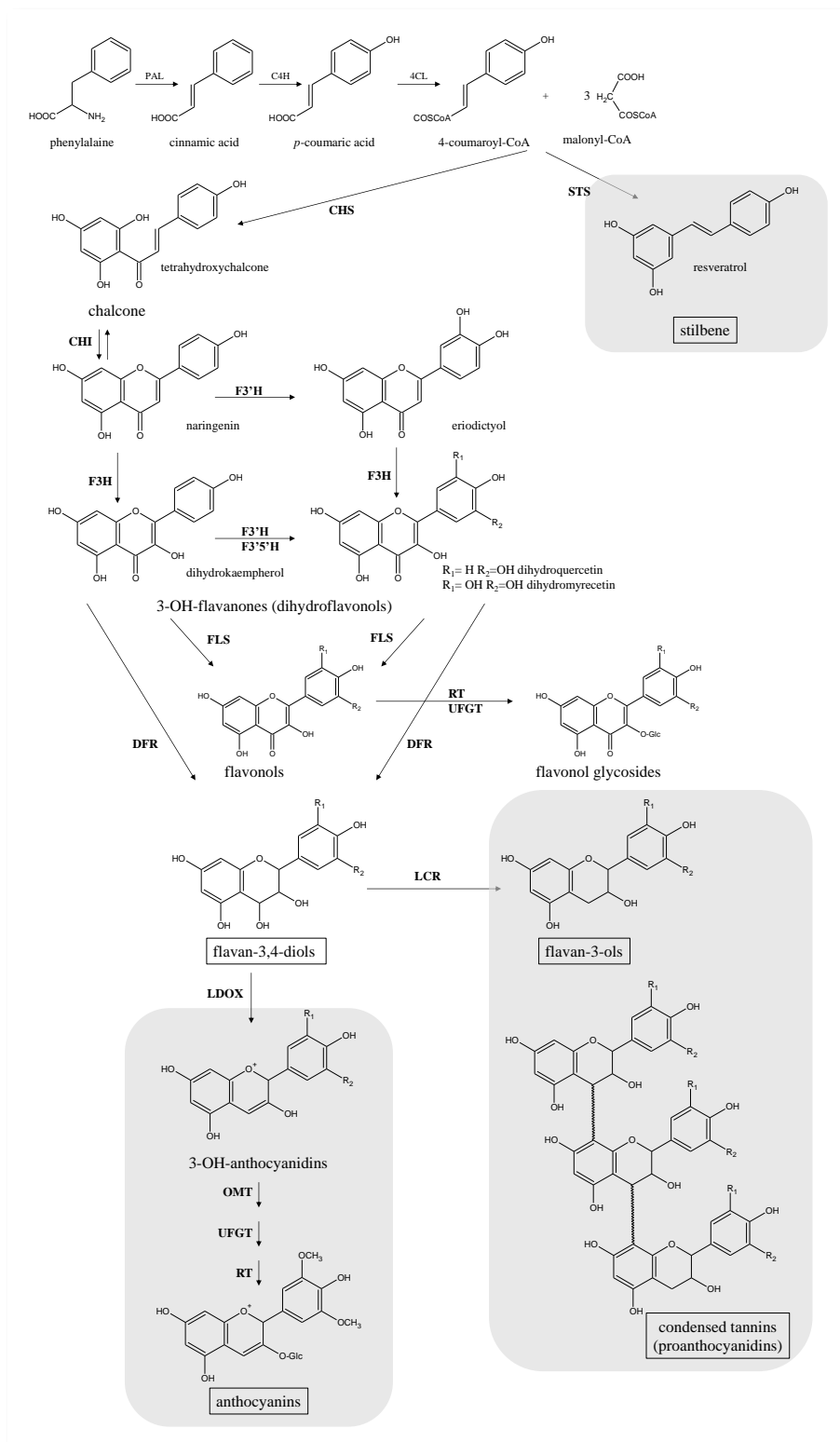


Figura 3.8. Ruta de biosíntesis de compuestos flavonoides Winkler-Shirley (2001).

Algunos autores han encontrado monómeros de derivados de flavan-3-ol, como son, (+)-catequina, (-)-epicatequina, epigallocatequina y epigallocatequín-3-*O*-galato en las pieles de las uvas (Cerpa-Calderón and Kennedy., 2008). Sin embargo, no existen muchos estudios que describan detalladamente la composición de derivados del flavan-3-ol en arándanos, ya que su importancia respecto a la actividad antioxidante es muy inferior a la de los antocianos comentados anteriormente. Gavrilova et al. (2011) midieron la concentración de diferentes familias fenólicas en cuatro variedades de arándanos. Para los flavan-3-oles, sólo pudieron medir dos compuestos, (+)-catequina y dímero B2, en tres de las variedades estudiadas, siendo sus concentraciones muy inferiores a las de otras familias fenólicas. Otros estudios, como el publicado por Garcia-Alonso et al. (2004), determinaron el contenido de flavanoles de bajo grado de polimerización (monómeros + dímeros + trímeros), pero no mostraron las concentraciones individualizadas de los compuestos identificados, sino la suma de todos ellos. Estos autores midieron las concentraciones de flavan-3-oles en 28 frutas, indicando que, normalmente, los monómeros (-)-epicatequina y (+)-catequina fueron los predominantes en los “*berries*”. Para el caso concreto de los arándanos, con una concentración total de flavan-3-oles de 44.46 mg/100 g materia seca, estos autores manifestaron que los dímeros y trímeros fueron los compuestos que predominaron, algo que no estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio. Por otro lado, Pascual-Teresa (2000), determinaron en arándanos, galocatequina, (+)-catequina, dímero B1, epicatequín-3-*O*-galato, dímero B2, (-)-epicatequina y autores como Ferguson et al. (2018), identificaron (+)-catequina, (-)-epicatequina, galocatequina y epigallocatequina en arándanos azules.

Flavonoles

En cuanto a los flavonoles, sólo el quercetín-3-*O*-glucósido, fue identificado y cuantificado, en dos de las variedades (Star y Millenia). La concentración de esta familia de compuestos obtenida para cada variedad se muestra en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Concentración de quercetín-3-*O*-glucósido (mg/100 g m.s.) (media, desviación estándar y grupos homogéneos) en las variedades de arándanos estudiadas.

	<i>Quercetín-3-O-glucósido</i>
Millenia	17.0±0.290 ^a
Star	84.1±0.115 ^b

La variedad Star presentó una concentración mayor a la variedad Millenia, siendo aproximadamente cinco veces superior a la que se obtuvo para la variedad Millenia, encontrándose diferencias significativas entre la concentración obtenida para cada variedad.

Taninos

Tanto los taninos hidrolizables como los condensados, han sido objeto de estudio debido a la actividad antioxidante que han presentado en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Vázquez-Flores et al., 2012). Debido a la dificultad de purificación, aislamiento, identificación y cuantificación, los taninos hidrolizables han recibido menos atención en cuanto al impacto sobre la salud humana (Côte et al., 2010; Monagas et al., 2010; Hagl et al., 2011). Sin embargo, se puede encontrar más fácilmente en la bibliografía estudios que revelan la actividad biológica de los taninos condensados (Beecher, 2003). Es por ello que en este estudio, se determinó la concentración de taninos presentes en las variedades de arándanos estudiadas. En la Figura 3.9, se muestra la concentración de taninos totales de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

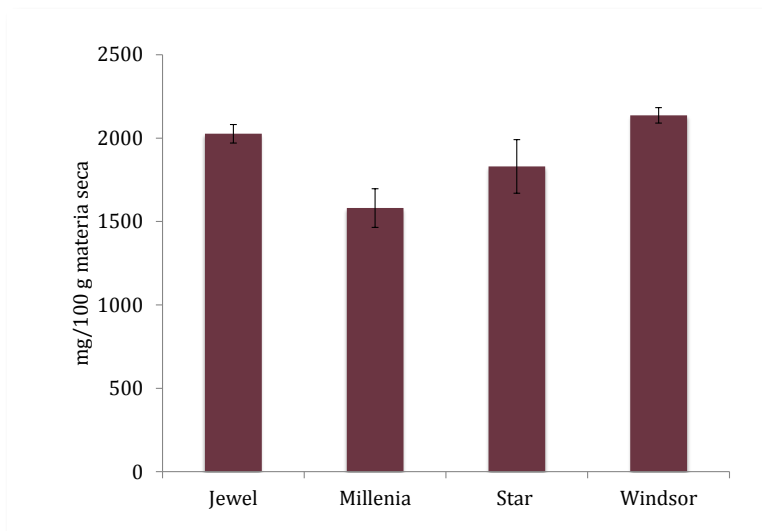


Figura 3.9. Concentración de taninos totales (media y desviación estándar) en las variedades de arándanos estudiadas.

En todas las variedades se obtuvieron altas concentraciones de taninos totales respecto a las concentraciones obtenidas de los demás compuestos. Los valores obtenidos para cada variedad oscilaron entre 1581 y 2136 mg/100 g m.s., siendo Windsor la variedad que mayor cantidad de estos compuestos obtuvo (2136 mg/100 g materia seca), seguida por Jewel (2026 mg/100 g m.s.), Star (1830 mg/100 g m.s.) y por último lugar Millenia (1581 mg/100 g m.s.).

Resveratrol

Otro compuesto bioactivo fenólico no flavonoideo presente en diferentes concentraciones en las todas las variedades en estudio fue el isómero *trans* del resveratrol. La Figura 3.10 muestra la concentración de *t*-resveratrol de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

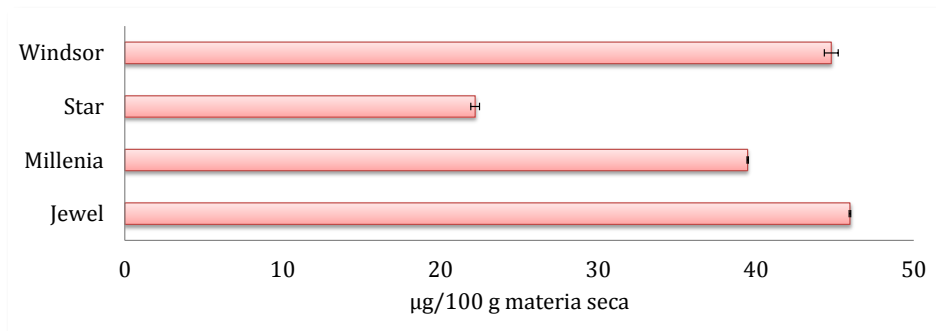


Figura 3.10. Concentración de *t*-resveratrol (media y desviación estándar) en las variedades de arándanos estudiadas.

La variedad que mayor concentración de este compuesto presentó fue Jewel, seguida de Millenia, Windsor y por último Star cuya concentración fue aproximadamente la mitad de lo que se obtuvo en las demás variedades (22.2 µg/100 g m.s.). La concentración de resveratrol es bastante más baja que la que cuantificó para los demás compuestos bioactivos, ya que este compuesto es sintetizado como respuesta a daños ocasionados en las bayas. Otros autores han encontrado la presencia de resveratrol en distintas variedades de arándanos (Lyons et al., 2003; Rimando et al., 2004). En concreto, en este último estudio donde usaron muestras liofilizadas de arándano completo el contenido de resveratrol encontrado en las diferentes variedades analizadas varió desde 7 hasta 5800 ng/g materia seca obteniendo para *Vaccinium Corymbosum* L. ("highbush") una concentración de resveratrol del fruto completo de 1074 ng/g m.s. Estos autores justificaron esta gran variación porque el resveratrol es sintetizado por la acción de la enzima estilbeno sintetasa sobre el *p*-cumaroil-CoA y tres unidades de malonil-CoA, lo que está codificado por una familia multigénica. Estos genes, son inducidos a estrés abiótico y biótico por la luz ultravioleta e infecciones como puede ser la *botrytis cinerea* y es por ello que las plantas sintetizan este compuesto. Por tanto, concluyeron que probablemente, la variabilidad de concentración de resveratrol entre las variedades que estudiaron, se deben a los diferentes factores de estrés.

Vitamina C

La vitamina C es un compuesto bioactivo presente en los arándanos y un gran agente reductor con elevada actividad antioxidante (Proteggente et al., 2002). En la Figura 3.11 se muestra la concentración de ácido L-ascórbico, dehidroascórbico y el contenido de vitamina C total de las cuatro variedades estudiadas. La vitamina C total fue medida como la suma del ácido dehidroascórbico y el ácido L-ascórbico.

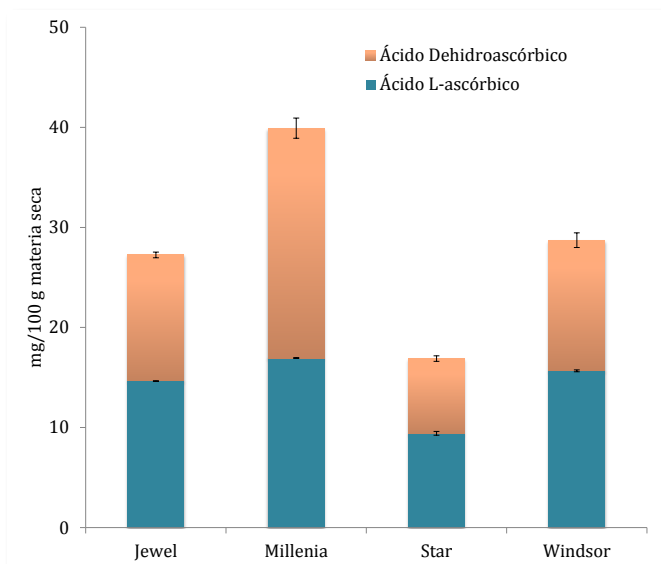


Figura 3.11. Concentración de vitamina C total (media y desviación estándar) en las variedades de arándanos estudiadas.

La variedad Millenia fue la que mayor contenido de Vitamina C total presentó (39.9 mg/100 g m.s.), seguida por Windsor y Jewel que mostraron valores similares y por último la variedad Star, cuyo contenido en vitamina C total fue menos de la mitad del que presenta la variedad Millenia (16.9 mg/100 g m.s.).

Análisis estadístico de la actividad antioxidante con los compuestos bioactivos.

Con el fin de facilitar la interpretación de las variables que mejor diferencian las cuatro variedades de arándanos estudiadas, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA). La Figura 3.12 muestra el plano que contiene las dos primeras componentes que explicarían el 90.38% del total de la variabilidad, además del autovector correspondiente a cada variable incluida en el análisis, así como los puntos obtenidos para cada variedad. Como se puede observar, las cuatro variedades fueron diferenciadas por la componente 1 que explica el 69.07% de la variabilidad, mostrando que las variedades Millenia, Jewel y Windsor presentaron valores positivos en esta componente, mientras que Star presentó valores negativos. Los parámetros que más influyen a esta componente fueron los antocianos y los derivados de flavan-3-ol, así como la vitamina C y el resveratrol. La componente 2, sólo se ve influenciada por el contenido de taninos totales, diferenciando las variedades Jewel y Windsor de Millenia y Star.

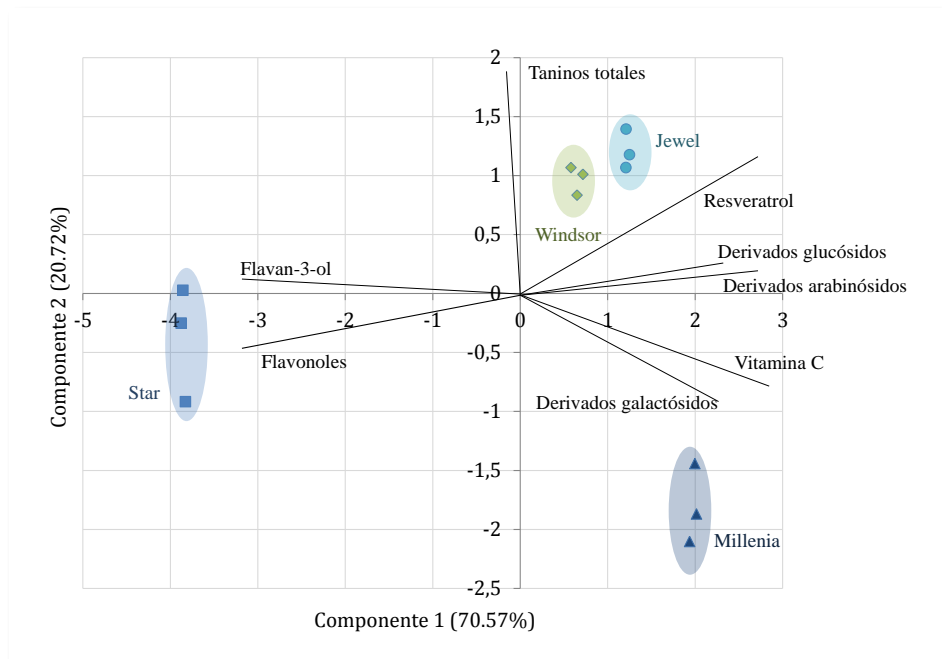


Figura 3.12. Biplot de análisis de componentes principales (PCA) de las variedades de arándanos estudiadas.

Actividad antioxidante

Es ampliamente conocido, según la bibliografía especializada, que los arándanos presentan una actividad antioxidante muy elevada. En este sentido, Garcia-Alonso et al. (2004), midieron este parámetro en 28 frutas y encontraron que los arándanos fueron los terceros que más actividad antioxidante presentaron. Por otro lado, Prior et al. (1998), encontraron que estos frutos presentaban una actividad antioxidante de las más elevadas entre 42 frutas y vegetales evaluados.

La actividad antioxidante se puede medir por diferentes técnicas, como las usadas por Grace et al. (2014). Estos autores midieron este parámetro en diferentes variedades de “berries” mediante ensayo DPPH, ensayo ABTS, el ensayo FRAP, encontrando en todos los casos resultados que se correlacionaban bien con el contenido fenólico de cada variedad de fruto.

La actividad antioxidante de las variedades de arándanos estudiadas fue determinada mediante el ensayo del DPPH que se basa en la capacidad del DPPH (radical libre) de reaccionar con antioxidantes presentes en el medio. Este método consiste en la reacción de decoloración del DPPH tras la captación de un protón del compuesto antioxidante, pasando del color violáceo característico del mismo a amarillo pálido. La reacción química que ocurre en este ensayo se muestra en la Figura 3.13.

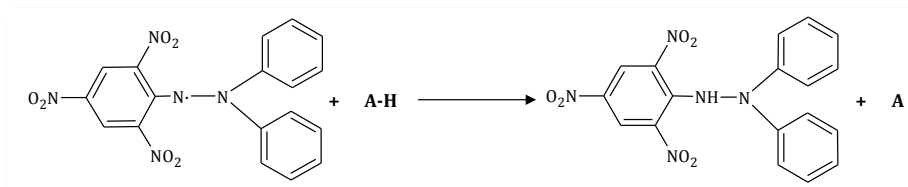


Figura 3.13. Reacción química del DPPH con un antioxidante.

La Figura 3.14 muestra los valores de actividad antioxidante de las cuatro variedades de arándanos estudiadas. La variedad Windsor fue la variedad que mayor valor de actividad antioxidante presentó (51.6 mmol TE/100 g m.s.). Este valor fue más del doble de la actividad antioxidante de las variedades Millenia y Star (25.3 y 22.9 mmol TE/100 g m.s.), respectivamente, siendo esta última la que menores valores de actividad antioxidante presentó.

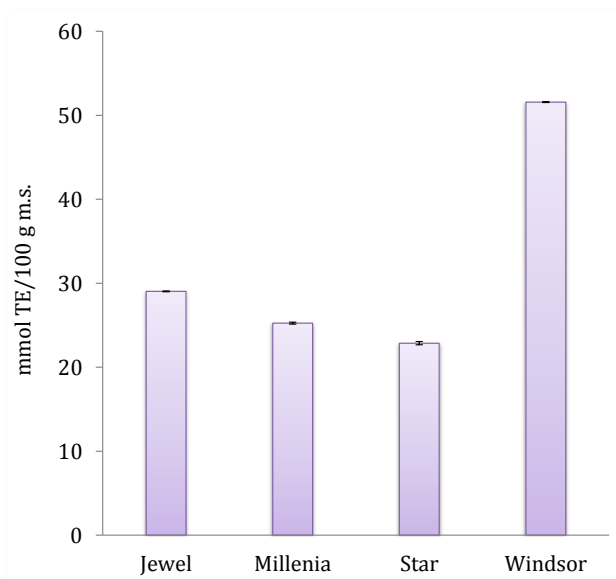


Figura 3.14. Valores de actividad antioxidante (media y desviación estándar) en las variedades de arándanos estudiadas.

Como ya se ha comentado anteriormente, numerosos trabajos han estudiado la composición polifenólica de estos frutos, encontrando todos ellos concentraciones elevadas de los mismos (Moyer et al., 2002; Wang et al., 2012). La actividad antioxidante de los arándanos ha sido atribuida en gran medida a la elevada concentración de compuestos fenólicos presentes en los mismos, especialmente flavonoides, entre ellos antocianos (Cho et al., 2004; Wang et al., 2012; Castrejón et al., 2008), así como en otras frutas (Serratosa et al., 2011; Rios de Souza et al., 2014). Además, siendo el *t*-resveratrol, un potente antioxidante (Fremont, 2000), aunque esté presente en pequeñas concentraciones, puede contribuir a la actividad antioxidante determinada en este estudio.

Con el objetivo de evaluar de forma aproximada la contribución de las diferentes familias de compuestos fenólicos así como de la Vitamina C a la actividad

antioxidante, se hizo un estudio de la influencia de los mismos individualmente a la actividad antioxidante.

Para ello, se prepararon diferentes disoluciones de concentraciones conocidas de estándares de las diferentes familias de compuestos bioactivos identificadas en este estudio. En concreto, se utilizó malvidín-3-*O*-galactósido, quercetín-3-*O*-glucósido, (+)-catequina y ácido L-ascórbico, ya que fueron los compuestos mayoritarios en la mayoría de las variedades.

A cada disolución de estándar se le realizó un análisis de actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH, de igual forma que se les hizo a las variedades de arándanos. Este análisis se realizó con el fin de establecer la relación que existe entre la actividad antioxidante y la concentración de las diferentes familias de compuestos bioactivos estudiadas, encontrando que existe una relación lineal en todos los casos, tal y como se muestra en la Figura 3.15, donde se muestra además la ecuación y el coeficiente de regresión.

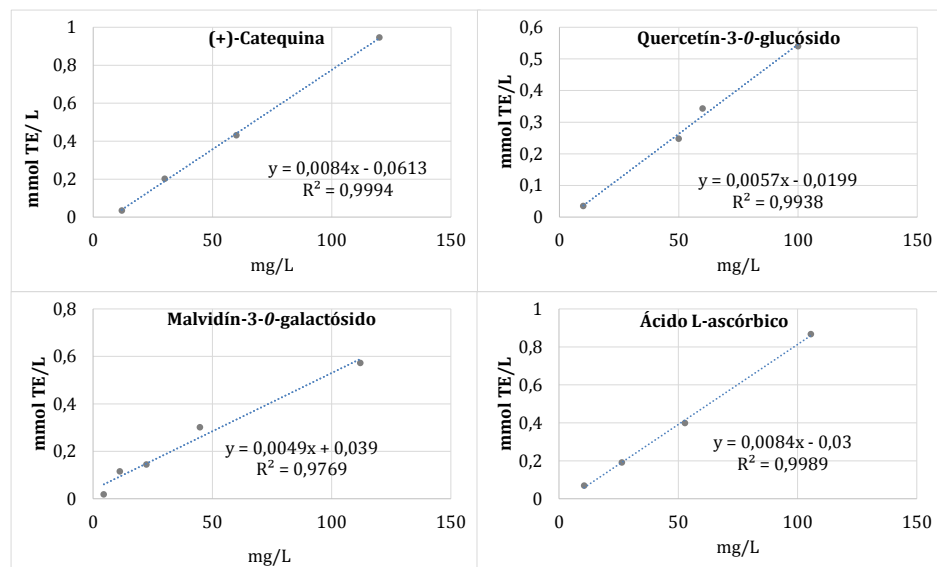


Figura 3.15. Relación de la actividad antioxidante con los compuestos mayoritarios identificados de cada familia.

De esta forma y suponiendo que se cuantificaron todos los compuestos responsables de la actividad antioxidante, se sustituyeron las concentraciones totales de cada familia de compuestos en la ecuación de regresión del compuesto mayoritario correspondiente, obteniéndose de esta forma, el valor de actividad antioxidante que aportaría cada familia a la actividad antioxidante total de cada variedad. A este valor de actividad antioxidante se le calculó el porcentaje respecto del valor total de actividad antioxidante obtenido para cada variedad. Este porcentaje representaría la contribución de cada familia de compuestos a la actividad antioxidante de cada variedad.

Por tanto, si las concentraciones totales de los derivados de flavan-3-ol fueron 17,9, 32,1, 37,8 y 143 mg/100 g materia seca para las variedades Millenia, Jewel, Windsor y Star, respectivamente, la contribución a la actividad antioxidante de esta familia de compuestos sería 0,5, 0,11, 4,73, y 0,37%, respectivamente. Los

flavonoles representaron un 0.22 y 1.92% del total de la actividad antioxidante de las variedades Star y Windsor, respectivamente. En el caso de los antocianos monoméricos identificados donde las concentraciones fueron 1221, 1381, 640 y 1054 mg/100 materia seca, la contribución a la actividad antioxidante total fue entre un 10% para la variedad Windsor y un 27% para la variedad Millenia. Por otro lado, la vitamina C contribuyó en valores muy bajos, siendo en la variedad Millenia, donde la contribución fue mayor al 1%. Otros autores han encontrado que la actividad antioxidante presenta una correlación más significativa con el contenido total de compuestos fenólicos y antocianinas (Kalt et al., 1999), mientras que la vitamina C aporta sólo una pequeña contribución del total de la actividad antioxidante; o incluso, hay otros autores (Borges et al., 2010) que afirman que la vitamina C no contribuye a los valores de la actividad antioxidante en arándanos azules.

Los valores de actividad antioxidante obtenidos en los extractos de las variedades en estudio fueron mayores que los correspondientes a la suma de lo que aportan los compuestos bioactivos separadamente. Por tanto, o bien se estarían produciendo procesos sinérgicos que influyen en los valores de la actividad antioxidante (Lu and Foo., 2001) o puede que otros compuestos no cuantificados en este estudio también posean actividad antioxidante. Algunos autores han encontrado que existe una fuerte relación entre los compuestos más polimerizados o compuestos de mayor peso molecular y la actividad antioxidante (Serratosa et al., 2011; Marquez et al., 2014).

A modo de resumen, la Figura 3.16 muestra las concentraciones totales de antocianos, flavonoles, derivados de flavan-3-ol, vitamina C, resveratrol y los valores de actividad antioxidante de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

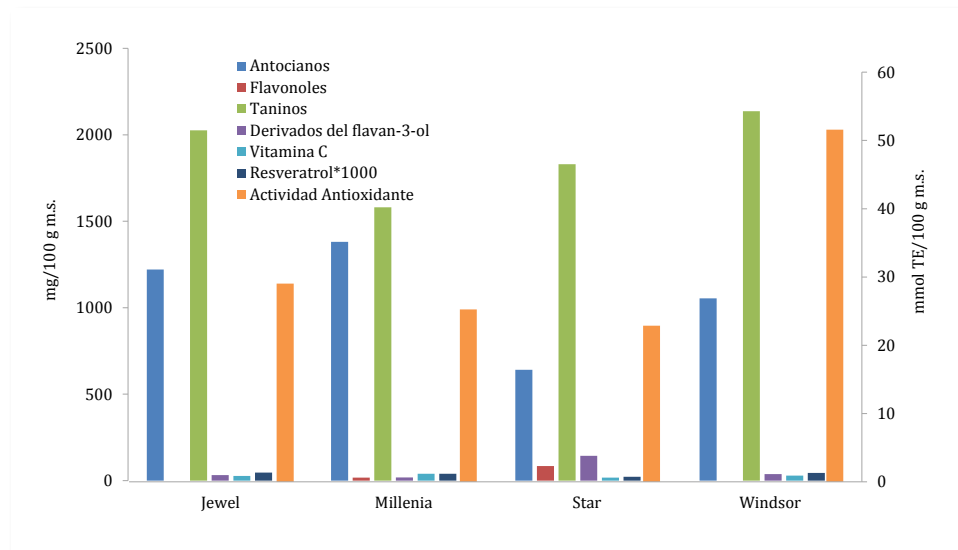


Figura 3.16. Eje primario: Concentración total de antocianos, flavonoles, derivados de flavan-3-ol, vitamina C, y taninos y de *t*-resveratrol ($\mu\text{g}/100 \text{ g m.s.} \cdot 1000$) en las variedades de arándanos estudiadas. **Eje secundario:** Valores de actividad antioxidante en las variedades de arándanos estudiadas.

En todas las variedades se pudo ver que los compuestos mayoritarios fueron los de mayor peso molecular, los taninos, seguido por los antocianos. Sólo se pudieron identificar flavonoles en dos variedades, Millenia y Star, y esta última variedad fue la que mayor concentración de derivados de flavan-3-ol presentó. De todas ellas la variedad que mayor valor de actividad antioxidante presentó fue Windsor. Esta variedad junto con Jewel fueron las que mayor concentración total de compuestos bioactivos y mayores valores de actividad antioxidante presentaron, siendo este hecho lo que se ha explicado anteriormente sobre la influencia de la composición de compuestos bioactivos en la actividad antioxidante.

En general, se pudieron identificar y cuantificar gran cantidad de compuestos bioactivos en las cuatro variedades de arándanos estudiadas y todas ellas presentaron valores de actividad elevados. De acuerdo al objetivo de este estudio, se podría decir que la variedad que presentaría mejores características en conjunto para ser procesada, es la variedad Windsor. Esta variedad fue la que presentó mayor concentración de compuestos bioactivos totales (3257 mg/100 g materia seca) y presentó el mayor valor de actividad antioxidante.

3.2.2 Piel y pulpa

Antocianos

En la Tabla 3.6 se muestra la concentración de antocianinas en las pieles y pulpas de las cuatro variedades estudiadas.

En la pulpa de las variedades, se identificaron seis antocianos en la variedad Jewel, cinco en Windsor y cuatro en Star y Millenia. En todas las variedades, el compuesto que se encontró en mayor concentración fue el malvidín-3-galactósido, teniendo una concentración que osciló entre 1 y 2.92 mg/100 g materia seca, en las variedades Star y Windsor respectivamente. Otro compuesto que estuvo en concentraciones mayores de 2 mg/100 g materia seca fue el derivado glucósido de la malvidina en la variedad Jewel (2.04 mg/100 g materia seca). El resto de compuestos quedaron por debajo de 1 mg/100 g materia seca. Su escasa presencia en la pulpa, se podría justificar como trazas de piel que quedaron en la pulpa tras el proceso de pelado manual que se llevó a cabo en el laboratorio para la preparación de las muestras, siendo esta concentración despreciable.

En las variedades estudiadas, se identificaron hasta 18 compuestos en la piel de la variedad Star, siendo esta la variedad donde mayor número de compuestos se identificaron y cuantificaron. Estos antocianos fueron los mismos que se identificaron en el fruto completo.

El compuesto mayoritario en la piel de las variedades Millenia y Windsor fue el derivado galactósido de la malvidina, que supuso el 17.4 y el 25.5% del total de antocianos, respectivamente en cada caso. En el caso de las variedades Jewel y Star los antocianos mayoritarios fueron el malvidín-3-*O*-glucósido en la primera y el delfinidín-3-*O*-galactósido en la segunda, representando un 16.2 y un 14.9%, respectivamente. En las tres últimas variedades, estaría de acuerdo con los autores Del Río et al. (2010) los cuales afirmaron que las antocianinas mayoritarias de los arándanos azules son el malvidín-3-*O*-arabinósido y los derivados 3-*O*-galactósidos de la cianidina, petunidina, malvidina y delfinidina.

Tabla 6. Concentración de antocianos (mg/ 100 g m.s.) (media y desviación estándar) en las pieles y las pulpas de las variedades de arándanos estudiadas.

	Jewel			Millenia			Star			Windsor		
	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa
Delfinidín-3-O-galactósido	905±46.0	0.354±0.046	1231±90.0	0.419±0.117	1128±21.0	0.589±0.177	1059±14.0	0.448±0.148	1059±14.0	0.448±0.148	1059±14.0	0.448±0.148
Cianidina-3-O-galactósido	56.1±0.611	n.d.	107±13.0	n.d.	356±10.6	n.d.	162±16.1	n.d.	162±16.1	n.d.	162±16.1	n.d.
Petunidín-3-O-galactósido	396±20.4	n.d.	784±56.0	n.d.	612±8.00	n.d.	604±24.0	0.532±0.164	604±24.0	0.532±0.164	604±24.0	0.532±0.164
Peonidín-3-O-galactósido	23.2±4.24	n.d.	64.8±12.9	n.d.	86.6±7.90	n.d.	73.6±4.80	n.d.	73.6±4.80	n.d.	73.6±4.80	n.d.
Malvidín-3-O-galactósido	936±56.0	2.22±1.00	1604±36.0	1.03±0.011	911±23.7	0.95±0.16	1753±34.0	2.91±0.012	1753±34.0	2.91±0.012	1753±34.0	2.91±0.012
<i>Total galactósidos</i>	2316±119	2.57±0.957	3790±184	1.45±0.128	3095±70.7	1.54±0.017	3652±79.0	3.89±0.322	3652±79.0	3.89±0.322	3652±79.0	3.89±0.322
Delfinidín-3-O-glucósido	608±12.0	0.240±0.014	472±48.0	n.d.	121±6.66	n.d.	178±9.00	n.d.	178±9.00	n.d.	178±9.00	n.d.
Cianidín-3-O-glucósido	54.4±8.40	n.d.	65.2±12.3	n.d.	38.2±1.43	n.d.	22.4±3.82	n.d.	22.4±3.82	n.d.	22.4±3.82	n.d.
Petunidín-3-O-glucósido	132±5.20	n.d.	n.d.	n.d.	133±3.21	n.d.	186±4.20	n.d.	186±4.20	n.d.	186±4.20	n.d.
Malvidín-3-O-glucósido	1075±10.0	2.04±0.638	1132±40.0	0.739±0.081	164±11.2	n.d.	332±14.0	n.d.	332±14.0	n.d.	332±14.0	n.d.
<i>Total glucósidos</i>	1869±15.6	2.28±0.652	1669±93.3	0.739±0.081	457±21.5	n.d.	718±29.4	n.d.	718±29.4	n.d.	718±29.4	n.d.
Delfinidín-3-O-arabinósido	760±20.0	0.532±0.017	891±42.0	n.d.	681±8.62	0.846±0.034	728±8.00	0.543±0.101	728±8.00	0.543±0.101	728±8.00	0.543±0.101
Cianidín-3-O-arabinósido	555±6.11	n.d.	476±40.0	n.d.	75.0±10.2	n.d.	188±20.0	n.d.	188±20.0	n.d.	188±20.0	n.d.
Petunidín-3-O-arabinósido	361±10.6	n.d.	459±34.0	n.d.	293±12.1	n.d.	460±28.0	n.d.	460±28.0	n.d.	460±28.0	n.d.
Malvidín-3-O-arabinósido	708±28.0	1.08±0.029	901±34.0	0.552±0.032	565±15.6	0.812±0.332	1115±30.0	2.57±0.170	1115±30.0	2.57±0.170	1115±30.0	2.57±0.170
<i>Total arabinósidos</i>	2384±72.6	1.62±0.012	2727±192	0.552±0.032	1614±291	1.66±0.366	2490±78.0	3.12±0.069	2490±78.0	3.12±0.069	2490±78.0	3.12±0.069
Peonidín-3-pentósido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14.6±4.86	n.d.	69.5±0.231	n.d.	69.5±0.231	n.d.	69.5±0.231	n.d.
Cianidina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8.53±1.27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Petunidina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.23±0.535	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Peonidina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	26.5±0.493	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidina	67.2±16.0	n.d.	73.9±8.20	n.d.	24.6±0.651	n.d.	21.8±3.53	n.d.	21.8±3.53	n.d.	21.8±3.53	n.d.
<i>Total Agliconas</i>	67.2±16.0	n.d.	73.9±8.20	n.d.	63.9±2.91	n.d.	21.8±3.53	n.d.	21.8±3.53	n.d.	21.8±3.53	n.d.
<i>Total Antocianos</i>	6636±169	6.47±1.60	8260±435	2.74±0.177	5244±146	3.20±0.349	6952±189	7.01±0.253	6952±189	7.01±0.253	6952±189	7.01±0.253

La Figura 3.17 muestra la concentración de antocianinas agrupadas por familias en las pieles de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

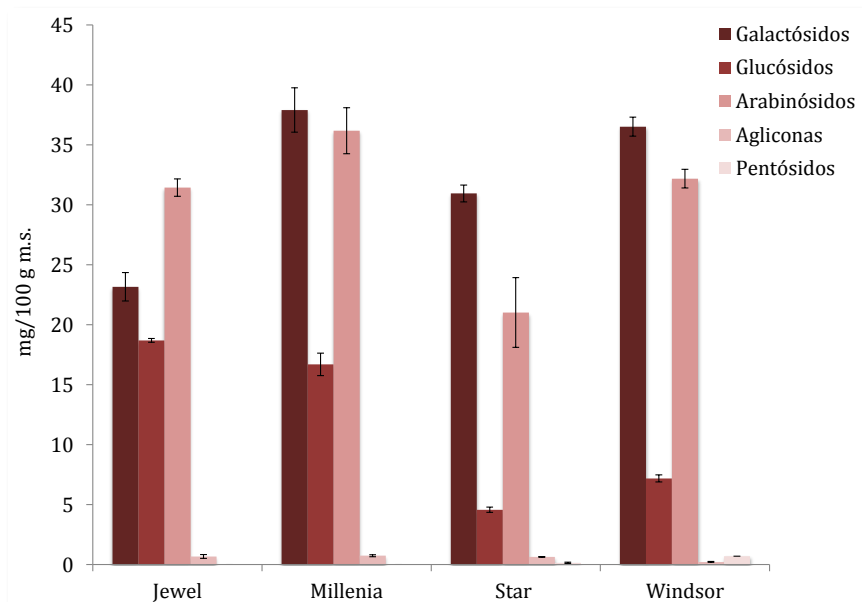


Figura 3.17. Concentración de antocianinas (media y desviación estándar) en las pieles de las variedades de arándanos estudiadas.

Se puede observar que la familia de los galactósidos fue la mayoritaria en las pieles de arándanos de las variedades Millenia, Star y Windsor (representando más del 45% del total de antocianos). En el caso de la variedad Jewel, la familia mayoritaria de antocianinas fue la de los arabinósidos que representaron el 35.9% del total de antocianos que contiene la piel de esta variedad.

La familia de los arabinósidos representó más del 30% del total de los antocianos en las pieles de todas las variedades, siendo la segunda familia mayoritaria en Millenia, Star y Windsor y la mayoritaria en Jewel, como ya se ha comentado. Se encontraron en todos los casos cuatro derivados glucosilados de la delfinidina, malvidina, peonidina y cianidina, siendo el glucósido de la malvidina el mayoritario dentro de esta familia en todas las variedades, representando entre un 36 y un 68% del total de los compuestos de su familia, para las variedades Star y Millenia respectivamente. Sólo se identificó el pentósido de la peonidina en dos variedades (Star y Windsor), contribuyendo al total de los antocianos en el caso de Star en 0.28% y en un 1% en la variedad Windsor. En el caso de las agliconas que se identificaron y cuantificaron, fue la variedad Star la que mayor contenido de las mismas presentó, teniendo cuatro agliconas en su composición (cianidina, petunidina, peonidina y malvidina). En las demás variedades sólo se encontró una aglicona, la malvidina.

En resumen, la variedad Millenia fue la que mayor concentración de antocianos presentó (8260 mg/100 g m.s.), seguida por Windsor (6952 mg/100 g m.s.), Jewel (6636 mg/100 g m.s.) y, por último, las pieles de la variedad Star, que presentó una concentración de 5244 mg/ 100 g de materia seca, que fue muy inferior a las demás (1.6 veces menor que Millenia).

En conjunto, la concentración en antocianinas de la pulpa fue más de 1000 veces menor que en la piel de los arándanos de todas las variedades. Se puede decir, que los antocianos están en la piel de los frutos siendo la concentración de estos compuestos en la pulpa despreciable.

Compuestos derivados de flavan-3-ol

En la Figura 3.18 se muestra la concentración de derivados de flavan-3-ol en la piel y en la pulpa de los arándanos estudiados, pudiéndose comprobar que las pieles de los arándanos presentaron mayor concentración de estos compuestos que las pulpas.

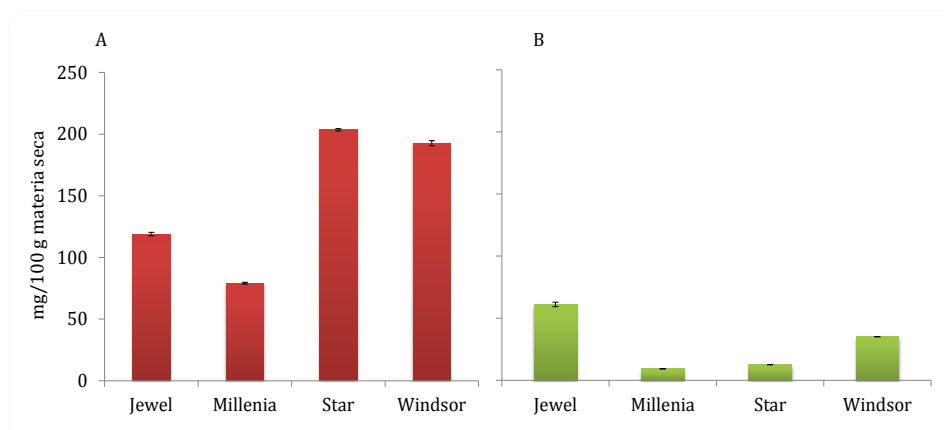


Figura 3.18. Concentración de compuestos derivados de flavan-3-ol (media y desviación estándar) en las pieles (A) y pulpas (B) de las variedades de arándanos estudiadas.

En la Tabla 3.7 se muestra la concentración de los compuestos derivados de flavan-3-ol de las cuatro variedades estudiadas. Como se puede observar, en la piel se identificaron 5 derivados diferentes (procianidina B1, (+)-catequina, (-)-epicatequina, epigallocatequín-3-*O*-galato y epigallocatequina) en todas las variedades, mientras que, en la pulpa, se identificaron cuatro derivados en Jewel, Millenia y Windsor (procianidina B1, (+)-catequina, (-)-epicatequina y epigallocatequín-3-*O*-galato), encontrándose en Star además la epigallocatequina. Además, puede observarse que la (+)-catequina fue el compuesto mayoritario de esta familia, representando más de un 40% del total de los derivados de flavan-3-ol en las pieles y las pulpas de todas las variedades, seguido por el epigallocatequín-3-*O*-galato.

Tabla 7. Concentración de compuestos de derivados de flavan-3-ol (mg/100 g m.s.) (media y desviación estándar) en pieles y pulpas en las variedades de arándanos estudiadas.

	Jewel			Millenia			Star			Windsor		
	Piel	Pulpa		Piel	Pulpa		Piel	Pulpa		Piel	Pulpa	
Procianidina B1	9.46±0.345	0.574±0.000		4.16±0.020	0.352±3E-04		8.28±0.111	1.17±1E-02		10.5±0.131	1.04±1E-03	
(+)-Catequina	51.7±1.03	3.69±0.019		40.1±0.010	6.13±0.023		93.0±2.27	32.0±1.16		98.1±3.64	23.6±0.110	
(-)-Epicatequina	5.64±0.276	1.98±0.126		8.60±0.252	1.81±0.023		12.2±0.505	7.49±0.824		12.9±0.559	4.11±0.026	
Epigallocatequina	16.0±0.184	n.d.		6.30±0.052	n.d.		6.86±0.033	1.83±0.326		13.9±1.09	n.d.	
Epigallocatequín-3-O-galato	36.1±0.577	3.01±0.197		19.9±0.414	4.29±0.024		83.3±3.58	18.6±1.52		57.3±3.02	6.41±0.016	
<i>Total derivados de flavan-3-ol</i>	119±1.39	9.26±0.090		79.1±0.734	12.8±0.028		204±0.965	61.1±1.82		193±2.13	35.1±0.061	

Tabla 8. Concentración de flavonoles (mg/100 g m.s.) (media y desviación estándar) en las pieles de las variedades de arándanos estudiadas.

	Jewel		Millenia		Star		Windsor	
	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa	Piel	Pulpa
Quercetín-3-O-glucurónido	92.7±10.4		n.d.		n.d.		n.d.	
Quercetín-3-O-glucósido	89.6±0.400		107±5.00		566±3.40		n.d.	
Kaempferol-3-O-glucósido	26.6±3.00		29.4±1.51		22.4±0.200		24.5±0.306	
Kaempferol-3-O-glucurónido	32.3±2.30		n.d.		16.5±0.020		41.7±3.10	
<i>Total Flavonoles</i>	241±9.50		136±6.54		605±3.18		66.2±3.40	

Flavonoles

En cuanto a los flavonoles, no se encontraron en la pulpa, pero sí se cuantificaron varios compuestos en la piel de las variedades estudiadas como se muestra en la Tabla 3.8.

Como se puede observar el kaempferol-3-*O*-glucósido estuvo presente en todas las variedades en concentraciones similares. En las variedades Jewel, Star y Windsor se determinó además el kaempferol-3-*O*-glucurónido, en concentraciones superiores al anterior. Se determinaron dos derivados del quercetín, el glucósido en Jewel, Millenia y Star; y el glucurónido sólo en la variedad Jewel. Esta variedad fue la que mayor concentración de flavonoles presentó. Estos frutos son conocidos por su contenido en flavonoles, como la quercetina, miricetina, kaempferol y sus derivados, que son beneficiosos para la salud (Mikulic-Petkovsek et al., 2012). Algunos autores sólo han determinado derivados del quercetín en variedades de arándanos, que suelen ser los flavonoles mayoritarios en estos frutos, encontrando derivados del kaempferol en otras bayas como las grosellas rojas (Borges et al., 2010; Cho et al., 2004). También en algunas variedades de arándanos se han encontrado derivados de laricitrin y siringetin (Gavrilova et al., 2011).

Taninos totales

En cuanto a la composición de taninos totales, se encontraron también concentraciones superiores en la piel que en la pulpa, pero no prácticamente ausentes como ocurría en el caso de los antocianos. La Figura 3.19 muestra la concentración de taninos totales de las pieles y pulpas de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

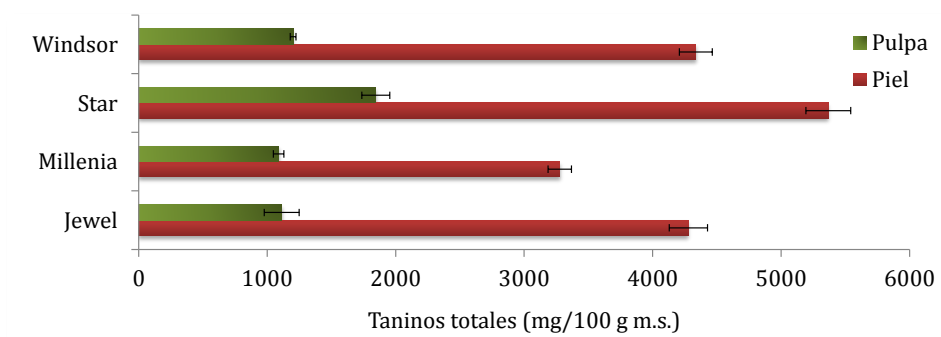


Figura 3.19. Concentración de taninos totales (media y desviación estándar) en las pieles y pulpas de las variedades de arándanos estudiadas.

Como se puede observar, la variedad Star fue la variedad que mayor cantidad de taninos presentó en la piel (53.7 mg/g m.s.), seguida por las variedades Windsor y Jewel que presentaron concentraciones parecidas (43.4 mg/g materia seca y 42.8 mg/g m.s., respectivamente) y por último la variedad Millenia (32.8 mg/g m.s.). Los valores de taninos totales presentes en la pulpa fueron aproximadamente tres veces menores que en la piel.

Vitamina C

Igual que se hizo en el fruto completo, se midió la vitamina C en la piel y en la pulpa por separado a fin de comprobar si la forma oxidada y/o la reducida de esta predominaba más en la piel o en pulpa.

La Figura 3.20 muestra la concentración de vitamina C en las pieles y las pulpas de las variedades de arándanos estudiadas. Se pudo comprobar que la cantidad de vitamina C total presente en la piel fue superior que la concentración que se tuvo en la pulpa. En la piel, la forma oxidada (ácido dehidroascórbico) de la vitamina C fue la que se encontró en mayor proporción, lo que podría ser lógico ya que la piel es la parte del fruto que se encuentra en contacto con el oxígeno. Este hecho podría confirmarse si se tiene en cuenta que en la pulpa ocurre lo contrario, la forma reducida es la que predomina en todas las variedades, ya que se encuentra protegida del oxígeno por la piel. La variedad que mayor cantidad de vitamina C total presentó en la piel fue Windsor (72.5 mg/100 g m.s.), seguida de la variedad Jewel, Millenia y por último Star (49.7 mg/100 g m.s.).

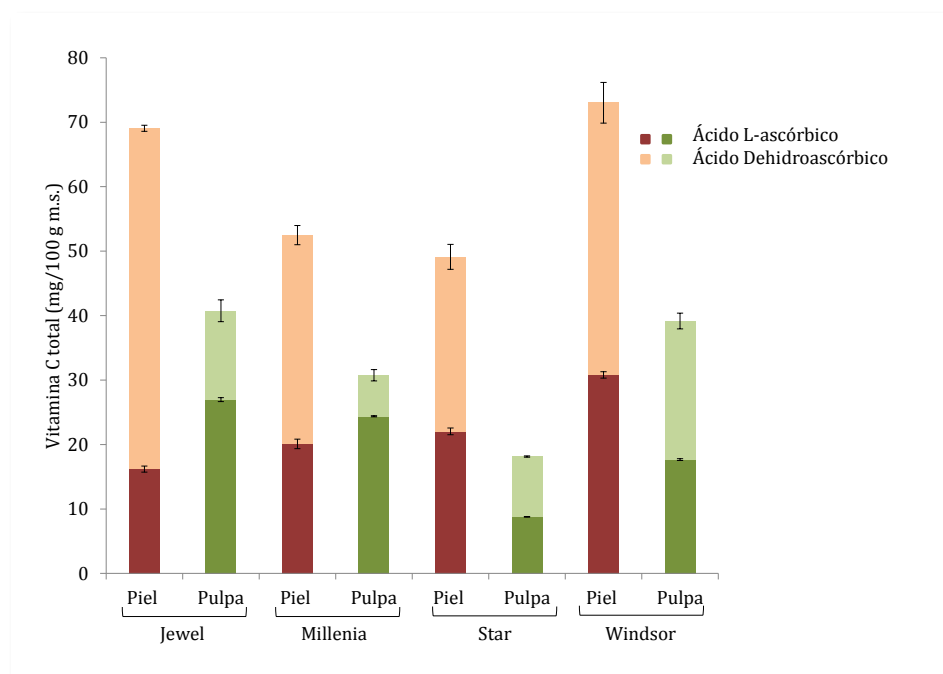


Figura 3.20. Concentración de vitamina C (media y desviación estándar) en las pieles y pulpas de las variedades de arándanos estudiadas.

Resveratrol

En la uva (*Vitis vinífera*), el *t*-resveratrol es el isómero que se encuentra en mayor cantidad y se encuentra mayoritariamente en la piel de la uva (50-100 µg/g fruta fresca) según lo encontrado por algunos autores (Shanmuganathan and Li., 2009). En las variedades estudiadas, se encontró sólo *t*-resveratrol en la piel. En la Figura

3.21 se muestra las concentraciones de *t*-resveratrol de las pieles de las cuatro variedades.

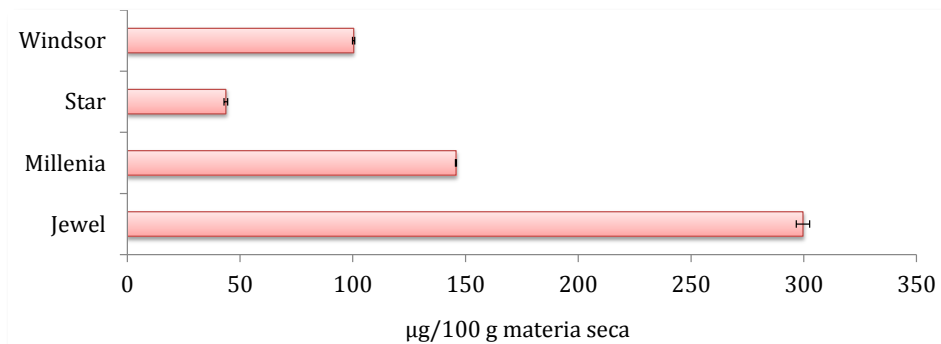


Figura 3.21. Concentración de *t*-resveratrol (media y desviación estándar) en las pieles de las variedades de arándanos estudiadas.

La variedad Jewel fue la variedad que mayor cantidad de resveratrol presentó, seguida de Millenia y Windsor, al igual que ocurrió en el análisis del fruto entero. Cabe destacar que la variedad Star, presentó una concentración aproximadamente siete veces menor a Jewel.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los arándanos proviene principalmente de la gran cantidad de compuestos fenólicos presentes en la piel de las bayas como se viene mostrando en los resultados obtenidos. Su et al. (2006) afirmaron que los arándanos "*highbush*", "*lowbush*" y "*rabbiteye*" presentan los compuestos fenólicos principalmente en la piel. La Figura 3.22 muestra la actividad antioxidante de la pulpa y de la piel de las diferentes variedades:

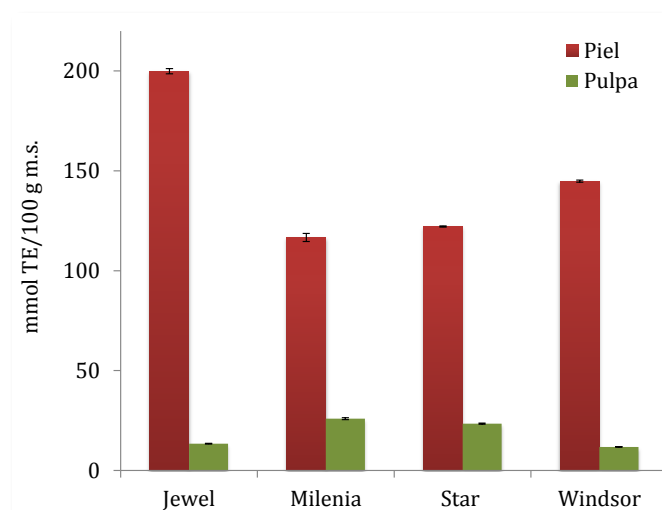


Figura 3.22. Valores de actividad antioxidante (media y desviación estándar) de las pieles y pulpas en las variedades de arándanos estudiadas.

Las variedades Millenia y Star presentaron aproximadamente valores de actividad antioxidante 5 veces mayor que sus pulpas y en el caso de las variedades Windsor y Jewel más de 10 veces mayor. Como se ha descrito anteriormente, numerosos autores han demostrado que entre los antioxidantes encontrados en los arándanos se encuentran compuestos flavonoideos, ácidos, taninos, estilbenos, vitamina C y que estos frutos han sido foco de investigación debido a su riqueza en antocianinas (Ríos de Souza et al., 2014; Santos et al., 2016; Prior et al., 1998; Vrhovsek et al., 2012; Reque et al., 2014; Kalt et al; 1999; Pereira Kechinski et al; 2010). Por lo que según todos los compuestos que se han determinado, la piel es mucho más rica en compuestos fenólicos y no fenólicos que la pulpa, por lo que es lógico que ésta presente mayor actividad antioxidante que esta última.

A modo de resumen de este capítulo, en la Tabla 3.9 se muestran las concentraciones totales de compuestos bioactivos cuantificados en las variedades de arándanos estudiadas.

Tabla 3.9. Contenido (%) de antocianos, flavonoles, taninos, compuestos derivados de flavan-3-ol, taninos, vitamina C total, *t*-resveratrol y actividad antioxidante en la piel y pulpa de las variedades de arándanos estudiadas.

		%Piel	%Pulpa
Antocianos	Jewel	99.9%	0.100%
	Millenia	100.0%	0.030%
	Star	100.0%	0.030%
	Windsor	99.9%	0.100%
Flavonoles	Jewel	100%	0.000%
	Millenia	100%	0.000%
	Star	100%	0.000%
	Windsor	100%	0.000%
Compuestos derivados de flavan-3-ol	Jewel	92.8%	7.20%
	Millenia	86.3%	13.7%
	Star	76.9%	23.1%
	Windsor	84.6%	15.4%
Taninos	Jewel	79.4%	20.7%
	Millenia	75.1%	24.9%
	Star	74.4%	25.6%
	Windsor	78.3%	21.7%
Vitamina C total	Jewel	62.9%	37.1%
	Millenia	62.9%	37.1%
	Star	73.3%	26.7%
	Windsor	65.0%	35.0%
<i>t</i>-resveratrol	Jewel	100%	0.000%
	Millenia	100%	0.000%
	Star	100%	0.000%
	Windsor	100%	0.000%
Actividad antioxidante	Jewel	93.7%	6.28%
	Millenia	81.8%	18.2%
	Star	83.9%	16.1%
	Windsor	92.5%	7.54%

4. Conclusiones/Conclusions

Conclusiones

1. En relación a los compuestos bioactivos de los frutos, la variedad con mayor concentración de antocianos y vitamina C fue Millenia, mientras que Star presentó el mayor contenido de compuestos derivados del flavan-3-ol, siendo Windsor la que presentó el mayor valor de actividad antioxidante.
2. En la piel fue donde se encontró la mayor concentración de compuestos bioactivos en las 4 variedades de arándanos estudiadas. Los antocianos, flavonoles y resveratrol estuvieron presentes exclusivamente en la piel. Por otro lado, los compuestos derivados de flavan-3-ol representaron entre un 76.9-92.8%; taninos entre un 74.4-79.4% y vitamina C entre un 62.9-73.3% en la piel de las variedades de arándanos.
3. La actividad antioxidante determinada en las pieles fue en todos los casos mayor que la de las pulpas, representando entre un 81.8-93.7% del fruto de cada variedad.
4. La variedad de arándanos Windsor presentó en conjunto una alta concentración de compuestos bioactivos y elevado valor de actividad antioxidante. Estas características, hacen que esta variedad sea adecuada para el procesado y obtención de bebidas alcohólicas con gran poder antioxidante y con gran cantidad de compuestos bioactivos. Además esta variedad presentó un tamaño de baya grande y valor de °Brix adecuado.

Conclusions

1. Regarding the bioactive compounds of the fruits, the variety with the highest concentration of anthocyanins and vitamin C was Millenia, while Star had the highest content of compounds derived from flavan-3-ol, Windsor had the highest value of antioxidant activity.
2. The skin presented the highest concentration of bioactive compounds in the 4 blueberry varieties studied. The anthocyanins, flavonols and resveratrol were present exclusively in the skin. The flavan-3-ol derivatives represented between 76.9-92.8%; tannins between 74.4-79.4% and vitamin C between 62.9-73.3% in the skin of the blueberry varieties.
3. The antioxidant activity determined in the skins was in all cases higher than that of the pulps, representing between 81.8-93.7% of the fruit of each variety.
4. The Windsor variety presented a high concentration of bioactive compounds and high value of antioxidant activity. These characteristics make this variety suitable for their processed to obtain alcoholic beverages with great antioxidant power and with a large number of bioactive compounds. In addition, this variety had a large berry size and adequate °Brix value.

ELABORACIÓN DE BEBIDAS DE ARÁNDANO

1. Introducción

Globalmente, el vino de uva es la bebida de fruta fermentada más producida a nivel mundial, seguida de la sidra de manzana. Sin embargo, otros “berries” son procesados para la obtención de vinos, ya que son ricos en antocianinas y otros compuestos fenólicos (Ortiz et al., 2013). En las últimas décadas, se ha incrementado el interés por el uso de diferentes “berries” y sus derivados debido a los beneficios que presentan para la salud (Müller et al; 2012). Se utilizan gran variedad de frutas para la elaboración de bebidas fermentadas como por ejemplo: manzanas, cerezas, grosellas, peras, ciruelas, fresas, arándanos, moras... (Arthey and Ashurst, 1996).

“L'Association des Industries des Cidres et Vins de fruits de l'U.E.” (A.I.C.V.) define vino de frutas como:

“Vins de fruits”: bebida obtenida por la fermentación total o parcial de los zumos de frutas frescos, concentrado o reconstituido, o pulpa de frutas comestibles frescas, distintas de la uva. Los vinos de frutas pueden ser con o sin gas, con o sin adición de agua, azúcar y alcohol vínico. Al producto fermentado se le puede añadir zumo fresco, concentrado o reconstituido, y/o aromas. El grado alcohólico que se le permite debe estar entre 1.2% y 14% en volumen. En el caso de que los vinos se fortifiquen, el grado alcohólico puede llegar hasta 22% v/v.

En general, el proceso de obtención de vinos de “berries”, es similar al del vino de uva. Las bayas son prensadas, el zumo resultante es fermentado y tratado posteriormente para su comercialización.

En España no se han comercializado aún vinos de arándano, pero si en América del sur, en concreto en Chile, donde desde 2010 se comercializan vino de este tipo, e incluso vinos espumosos de arándano.



Figura 4.1. Vinos de arándano comercializados en América.

Algunos de los problemas que presenta la elaboración de estos productos, es el precio del fruto y la baja concentración de azúcares en comparación con la uva (Santos et al., 2016), lo cual limita el grado alcohólico final de la bebida que se quiera obtener. Además, son frutos que contienen alta concentración de pectinas que confieren viscosidad, que junto al bajo pH del fruto, pueden ocasionar la gelificación del zumo inicial.

El objetivo de este estudio ha sido minimizar estos factores limitantes para poder obtener dos nuevos productos: vino seco de arándano y vino dulce de arándano. En primer lugar, para impedir la gelificación, se utiliza como base una mezcla del zumo de arándano con una disolución azucarada. Además, el incremento del contenido en azúcar consigue obtener el grado alcohólico deseado en el producto final (12-13% v/v).

Otro factor importante a tener en cuenta en una fermentación es la elección de la temperatura. Se sabe que la temperatura así como el tiempo de contacto con las pieles durante el proceso de vinificación, son dos factores importantes que influyen en las características de los vinos finales (Gao et al., 2015). Por ejemplo, en maceraciones enzimáticas a bajas temperaturas, la calidad del color mejora (Gómez-Plaza et al., 2000), las concentraciones de polisacáridos y las proantocianidinas aumentan con el tiempo de maceración aunque el color y el contenido de antocianinas hagan lo contrario (Gil et al., 2015). Además a baja temperatura de fermentación se logran obtener vinos más aromáticos.

Un segundo objetivo fue evaluar la influencia de las condiciones de fermentación, temperatura y tiempo de fermentación, en la composición y características organolépticas de vinos de arándanos.

2. Material experimental

Para la elaboración de las bebidas se usaron arándanos de la variedad Windsor cultivados en Moguer (Huelva) recolectadas en la cosecha del año 2015. Los arándanos fueron almacenados a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesado. El proceso seguido para la elaboración de bebidas se muestra en la Figura 4.2.

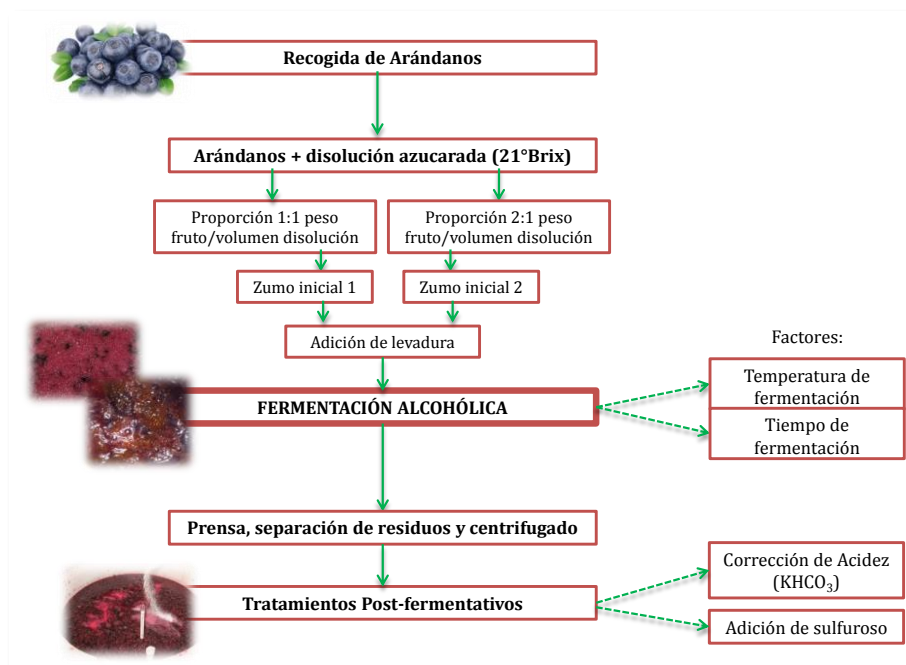


Figura 4.2. Diagrama del proceso de elaboración de vinos de arándano.

- Preparación del zumo inicial: los arándanos descongelados se estrujaron junto a una disolución azucarada ajustando la concentración de azúcares de la mezcla hasta $21\text{ }^{\circ}\text{Brix}$, con el fin de obtener vinos con una graduación alcohólica entre 12 y 13% v/v. Las mezclas se hicieron en dos proporciones, una de ellas 1:1 (peso fruto/volumen disolución azucarada), obteniendo el zumo inicial 1. Por otro lado, en proporción 2:1, donde se puso el doble de cantidad de fruto que de volumen de disolución azucarada, y teniendo así el zumo inicial 2.
- Preparación del inóculo: Los zumos iniciales se dividieron en lotes de 500 mL (manteniendo las partes sólidas del fruto) introducidos en matraces de 1 L, sumergidos en baños de agua a temperatura controlada (Figura 4.3). A estos zumos se les añadió el inóculo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* CT 007 (0.3 g/L) según las recomendaciones del proveedor.
- Proceso fermentativo: Los zumos iniciales se sometieron a un proceso de fermentación macerando a la vez con las partes sólidas a dos temperaturas diferentes de 17 y $21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dos matraces de cada zumo inicial se dejaron fermentar totalmente, hasta que las levaduras agotaron los



azúcares, obteniendo los respectivos vinos V1T y V2T. Mientras que en los otros dos la fermentación fue parcial y se detuvo la fermentación cuando el grado alcohólico alcanzó entre 6 y 7 % v/v añadiendo alcohol vínico hasta 12-13% v/v para igualar con el grado alcohólico de las bebidas de fermentación total y se obtuvieron de esta forma los vinos de fermentación parcial V1P y V2P. Por tanto, según los distintos factores utilizados, se obtuvieron 8 bebidas alcohólicas diferentes como se puede ver en la Figura 4.3.

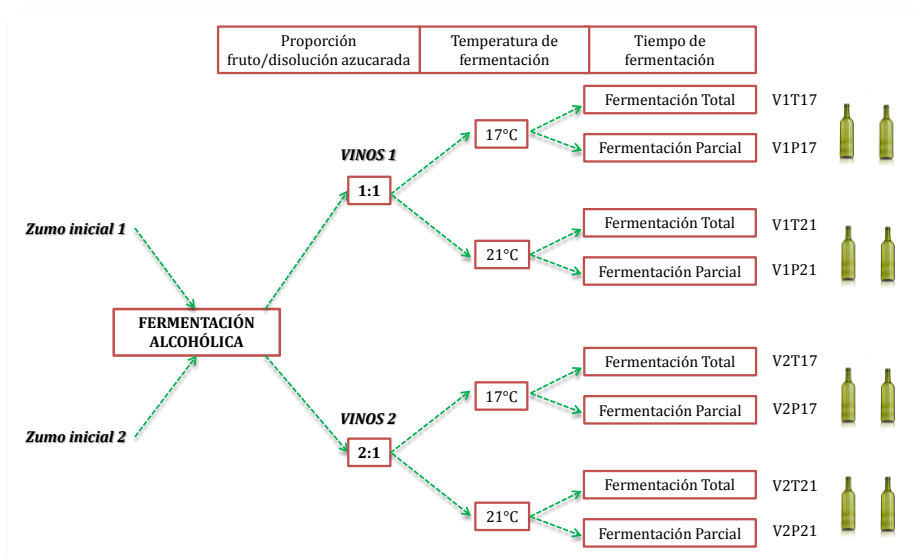


Figura 4.3. Bebidas obtenidas según los diferentes factores utilizados.

El seguimiento de las distintas fermentaciones se hizo mediante la medida de la pérdida de peso debido al desprendimiento de dióxido de carbono (g/L), la cual se relacionó con el grado alcohólico teórico que poseían las bebidas en cada momento mediante la siguiente ecuación empírica.

$$\% \text{Etanol } (V/V) = \frac{0.94x (\text{CO}_2 \text{ perdido}) + 2.7}{7.89}$$

- Prensado: tras las fermentaciones, la masa de fermentación fue prensada, separando el líquido de los sólidos restantes y por último se centrifugó el líquido resultante de cada caso.
- Tratamientos postfermentativos: debido a que los arándanos son frutos bastante ácidos, las bebidas obtenidas también lo fueron, con lo que para mejorar las cualidades organolépticas de las mismas, se corrigió la acidez con bicarbonato potásico de uso alimentario (E-501) en una dosis de 1 g/L (dosis límite 1.3 g/L según Reglamento (CE) N° 479/2008). Además, se añadió metabisulfito potásico de uso vínico (E-224) a modo de conservante en una dosis de 150 mg/L según el reglamento (CE) N° 1622/2000.
- Almacenamiento de los vinos: las bebidas corregidas se mantuvieron en reposo 24 horas antes de embotellarlas y posteriormente se almacenaron a 4°C en botellas bordeesas de vidrio verde con tapones de corcho estándar UNE-EN-12726 – 18.5mm.

3. Resultados y Discusión

3.1. Características de los zumos iniciales de arándano

En la elaboración de bebidas fermentadas se tienen que tener en cuenta varios factores que determinan la calidad del producto final. Algunos de los parámetros generales más relevantes son el contenido de azúcares reductores, pH y la acidez volátil.

Ambos zumos se ajustaron a un contenido en azúcares de 21 °Brix, lo que corresponde a 203 g/L de azúcares. El grado alcohólico de las bebidas al fermentar totalmente estos azúcares fue entre 12-13 % v/v. La Tabla 4.1 muestra los valores de los parámetros generales de los zumos iniciales que se sometieron al proceso de fermentación.

Tabla 4.1. Parámetros generales de los zumos iniciales de arándano (media y desviación estándar).

	Zumo inicial 1	Zumo inicial 2
pH	2.78±0.006	2.98±0.007
Acidez volátil (meq ácido acético/L)	0.000±0.000	0.000±0.000
Absorbancia 420 nm	0.881±0.016	1.16±0.000
Absorbancia 520 nm	1.13±0.005	2.05±0.016
PPC	0.195±0.001	0.215±0.003
Actividad antioxidante	2.05±0.089	3.53±0.155

Los valores de pH y acidez volátil de los zumos iniciales fueron medidos para controlar el proceso. Como se puede observar, ambos zumos presentaron un valor de pH por debajo de 3, con lo que eran bastantes ácidos. Esta característica impediría la proliferación de la mayoría de las bacterias perjudiciales y por otro lado podría ser un freno para las levaduras. Por ejemplo, las bacterias lácticas, proliferan mejor a pH mayor de 3.5; las acéticas a pH mayor de 4.5; etc. Según algunos autores el pH óptimo para el crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica oscila en el rango de 3 y 5 (Ward et al., 1991).

La acidez volátil, principalmente en forma de ácido acético, puede desempeñar un importante papel en el aroma del vino, incluso una concentración excesiva de este subproducto de la fermentación alcohólica, puede ser altamente perjudicial para la calidad del vino (Bely et al., 1990), y puede determinar la aceptación del producto por los consumidores (Hong-Guang et al., 2012). Este producto secundario de la fermentación alcohólica se puede ver afectado por las condiciones del medio, la cepa de levadura, la concentración de azúcar inicial y las condiciones de fermentación, tales como las variaciones de temperatura. El valor de acidez volátil de ambos zumos fue de 0, con lo que las características de estos zumos para su fermentación fueron adecuadas.

En relación a los parámetros de color, los valores de absorbancia a 420 y 520 nm se pueden considerar como la contribución a los tonos pardos y rojos, respectivamente. Los valores de absorbancia del zumo 2 fueron prácticamente el

doble que la correspondiente para el zumo 1, lo que es lógico debido a que el zumo 2 se preparó con el doble de proporción de fruto que el zumo 1. Además, en ambos zumos los valores de absorbancia a 520 nm fueron mayores que los correspondientes a 420 nm. Para evaluar mejor el color se puede utilizar la relación entre ambos valores de absorbancia, que se denomina tonalidad. Este valor (A_{420}/A_{520}) nos da una idea de la relación de los tonos rojos y pardos de una bebida. Con esta relación, podemos saber si una bebida es más roja que parda, según si el valor resultante es mayor o menor que 1. Según esto se puede comprobar que la tonalidad fue siempre menor que 1, y la contribución de los tonos rojos fue mayor que la de los tonos pardos. En concreto el valor de tonalidad del zumo 1 fue 0.780, siendo en el zumo 2 de 0.566, por lo que este último presentó una mayor contribución de los tonos rojos respecto de los tonos pardos.

La presencia de compuestos poliméricos es interesante, debido a que son compuestos que favorecen la estabilidad del color con el tiempo (Castillo-Sánchez et al., 2008). Por ello, se calculó el valor del color de pigmentos poliméricos (PPC) en los zumos iniciales. Como se puede observar, el valor de este parámetro de color fue superior en el zumo 2 que en el zumo 1, aunque la diferencia no fue tan alta como en el caso de otros parámetros de color.

Los “*blueberries*” o arándanos azules son conocidos por sus propiedades beneficiosas para la salud, debido al contenido en antocianos y proantocianidinas (Smith et al., 2000), al igual que la uva tinta (Marquez et al., 2014).

Los mostos y vinos tintos de uva son conocidos por contener compuestos flavonoideos, como flavonoles (quercetina), compuestos derivados de flavan-3-ol (catequina) y antocianos (malvidín-3-*O*-glucósido). Además, estas bebidas contienen proantocianidinas, que son oligómeros y polímeros de unidades de flavan-3-ol polihidroxilados, que constituyen una proporción significativa del contenido fenólico (Burns et al., 2001). Sanchez-Moreno et al. (2003) compararon vinos de arándanos con vinos de uva tinta viendo que las concentraciones de compuestos fenólicos totales, antocianinas totales y actividad antioxidante fueron parecidas.

En relación a la composición de antocianinas hay que tener en cuenta que las pieles del fruto estuvieron en contacto con la fase líquida durante el proceso de prensado/estrujado, por lo que en este tiempo se produjo un proceso de maceración, donde parte de los compuestos de las pieles pasaron al líquido. Como se ha explicado anteriormente (capítulo 3), las pieles de los arándanos son la parte donde se encuentran la mayor parte de los compuestos fenólicos, con lo que la presencia de estas durante el proceso de elaboración de los vinos, la temperatura y el tiempo de fermentación, podrían determinar el contenido de estos compuestos en las bebidas finales.

La Tabla 4.2 muestra la concentración de las antocianinas de los zumos iniciales. Como puede observarse, en los zumos de arándanos se determinaron derivados galactósidos, glucósidos, arabinósidos de las antocianidinas malvidina, petunidina, peonidina, cianidina y delfinidina, además de algunas de estas agliconas. En concreto en el zumo 1 se cuantificaron 13 compuestos, mientras que el zumo 2 el número de antocianinas cuantificadas fue 16.

Tabla 4.2. Concentración de antocianinas (mg/L) (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los zumos iniciales.

	Zumo inicial 1	Zumo inicial 2
Delfinidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.642±0.004	1.63±0.124
Cianidín-3- <i>O</i> -galactósido	n.d.	5.14±0.555
Petunidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.650±0.005	6.50±0.608
Peonidín-3- <i>O</i> -galactósido	n.d.	2.44±0.224
Malvidín-3- <i>O</i> -galactósido	5.83±0.047	29.3±2.80
Total galactósidos	7.13±0.056	45.0±4.23
Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	1.31±0.002	0.854±0.008
Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	n.d.	1.62±0.092
Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido	2.95±0.005	12.9±1.14
Total glucósidos	4.26±0.007	15.4±1.10
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.595±0.002	0.781±0.055
Cianidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.801±0.005	2.25±0.170
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.825±0.010	2.21±0.133
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinósido	3.23±0.016	13.9±1.15
Total arabinósidos	5.45±0.030	19.2±1.26
Cianidina	0.559±0.002	1.50±0.056
Petunidina	0.522±0.007	1.07±0.086
Peonidina	0.734±0.343	0.564±0.016
Malvidina	0.646±0.004	1.94±0.120
Total agliconas	2.46±0.353	5.07±0.059
Peonidín-3-pentósido	n.d.	n.d.
Total antocianos	19.3±0.407^a	84.6±5.43^b

La familia mayoritaria en ambos casos fue la de los galactósidos, seguida de los arabinósidos y los glucósidos y por último las agliconas. El antociano mayoritario fue el malvidín-3-*O*-galactósido, que representó un 30.0 y 34.6% del total de antocianinas para el zumo 1 y 2 respectivamente. El malvidín-3-*O*-arabinósido fue el compuesto que siguió a este y representó un 16.7 y 16.4% del total respectivamente, representando el malvidín-3-glucósido un 15% del total en ambos casos. Por tanto, los derivados de la antocianidina malvidina son las antocianinas mayoritarias en los zumos de arándanos. En el zumo 1, excepto los derivados de la malvidina, todos los compuestos cuantificados presentaron concentraciones inferiores a 1 mg/L. En el zumo 2 todos los compuestos cuantificados, excepto delfinidín-3-*O*-glucósido y peonidina, presentaron concentraciones hasta 10 veces superiores a los correspondientes del zumo 1. En relación al contenido total de esta familia, el zumo 2 presentó una concentración de antocianinas 4 veces superior al zumo 1 debido principalmente a la mayor proporción de fruto en la preparación de este zumo.

Otro grupo de compuestos flavonoideos son los compuestos derivados del flavan-3-ol. La Tabla 4.3 muestra las concentraciones de estos compuestos en los zumos iniciales. Como puede observarse, en el zumo 1 se identificaron 5 compuestos, epigallocatequín-3-*O*-galato, epigallocatequina, (+)-catequina, (-)-epicatequina y

procianidina B1. En el zumo 2 se cuantificó además de estos, procianidina B2. En el caso del zumo 1 el compuesto mayoritario fue epigallocatequín-3-*O*-galato que representó un 38.1% del total de esta familia, mientras que en zumo 2, el compuesto mayoritario fue catequina representando un 50.4% del total de derivados del flavan-3-ol, siendo epigallocatequín-3-*O*-galato un 34.8% del total. En relación a la concentración total de esta familia, el zumo 2 presentó un valor 2.6 veces superior al zumo 1.

Tabla 4.3. Concentración de compuestos derivados del flavan-3-ol (mg/L) (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los zumos iniciales.

	Zumo inicial 1	Zumo inicial 2
Epigallocatequín-3- <i>O</i> -galato	3.15±0.008	7.51±0.071
Epigallocatequina	0.918±0.084	0.917±0.185
Procianidina B1	1.10±0.074	0.156±0.022
(+)-Catequina	2.74±0.036	10.9±0.408
Procianidina B2	n.d.	1.37±0.094
(-)-Epicatequina	0.364±0.019	0.723±0.063
Total flavan-3-ol	8.27±0.161^a	21.6±0.264^b

Dentro de los compuestos que se identificaron, (+)-catequina, (-)-epicatequina y epicatequín-3-*O*-galato han sido encontradas también en el hollejo de uvas del género *Vitis vinifera* (Su and Singleton, 1969) y en vinos de uva (De Freitas et al., 2000). Sanchez-Moreno et al., 2003 encontraron que en los vinos de arándanos que analizaron, la concentración de monómeros era mayor que la composición en dímeros, al igual que ocurre en este estudio.

En relación a los flavonoles, la Tabla 4.4 muestra la concentración de estos compuestos en los zumos 1 y 2. Se identificaron y cuantificaron en total 4 flavonoles, dos de ellos derivados de la quercetina, quercetín-3-*O*-glucósido y quercetín-3-*O*-glucurónido; y otros derivados del kaempferol, kaempferol-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucurónido. Como se puede observar, el compuesto mayoritario fue quercetín-3-*O*-glucurónido, que representó un 53.6 y 49.6% del total de los flavonoles en el zumo 1 y 2, respectivamente. En relación a la concentración de esta familia el zumo 2 presentó un valor 1.35 veces mayor que el zumo 1.

Tabla 4.4. Concentración de flavonoles (mg/L) (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los zumos iniciales.

	Zumo inicial 1	Zumo inicial 2
Quercetín-3- <i>O</i> -glucósido	0.808±0.017	1.99±0.080
Quercetín-3- <i>O</i> -glucurónido	7.13±0.004	8.94±0.048
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	3.14±0.015	3.91±0.024
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucurónido	2.23±0.017	3.13±0.017
Total flavonoles	13.3±0.043^a	18.0±0.135^b

Los flavonoles presentes en los arándanos son compuestos que contribuyen a la actividad antioxidante del fruto (Zheng et al., 2003). Algunos autores han estudiado la composición de estos compuestos y han encontrado una concentración entre 24-28.5 mg/ kg fruta fresca, llevando a cabo la cuantificación con HPLC (Häkkinen et al., 1999; Bilyk and Sapers; 1986).

La Tabla 4.5 muestra las concentraciones de taninos totales y vitamina C total de los zumos iniciales de arándano. En relación a los taninos son compuestos que presentan actividad antioxidante, con lo que son beneficiosos para la salud humana. Además, son compuestos de alto peso molecular que intervienen en las características de la bebida final. Estos compuestos se pudieron cuantificar en los zumos de partida. El zumo 2 presentó mayor concentración de taninos que el zumo 1, lo cual es lógico, ya que para la preparación del zumo 2, se utilizó el doble de cantidad de fruto.

Tabla 4.5. Concentración de taninos totales (g/L) y vitamina C total (mg/L) (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los zumos iniciales.

	Zumo inicial 1	Zumo inicial 2
Taninos totales (g/L)	6.48±0.077 ^a	7.86±0.030 ^b
Vitamina C total (mg/L)	11.1±0.001 ^a	14.8±0.044 ^b

Los zumos y vinos de arándano, contienen vitamina C, la cual no está presente en los zumos y vinos de uva. La vitamina C se pudo encontrar en sus dos formas en los zumos de partida, la forma reducida (ácido L-ascórbico) y la forma oxidada (ácido dehidroascórbico). El zumo 2 presentó mayor concentración de vitamina C total que el zumo 1 al igual que ocurría con los compuestos anteriores debido a la mayor proporción de fruto utilizado en la preparación de este zumo.

La actividad antioxidante fue medida por el método del DPPH, que es un ensayo colorimétrico rápido, simple y económico. Este método es utilizado normalmente para determinar los valores de actividad antioxidante en alimentos (Hangun-Balkir and McKenney., 2012). La Tabla 4.6 muestra los valores de la actividad antioxidante obtenidos para los zumos.

Tabla 4.6. Valores de actividad antioxidante (mmol TE/L) (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los zumos iniciales.

	Zumo inicial 1	Zumo inicial 2
Actividad antioxidante (mmol TE/L)	2.05±0.089 ^a	3.53±0.155 ^b

Cómo se puede observar, al igual que ocurría con todos los valores anteriores, la actividad antioxidante del zumo 2 fue mayor que la del zumo 1, debido fundamentalmente a su mayor contenido en compuestos bioactivos.

3.2. Curvas de fermentación

El desarrollo de la fermentación se siguió mediante la obtención de las curvas de fermentación. La Figura 4.4 muestra las curvas de fermentación parcial y total para la obtención de los vinos de arándano.

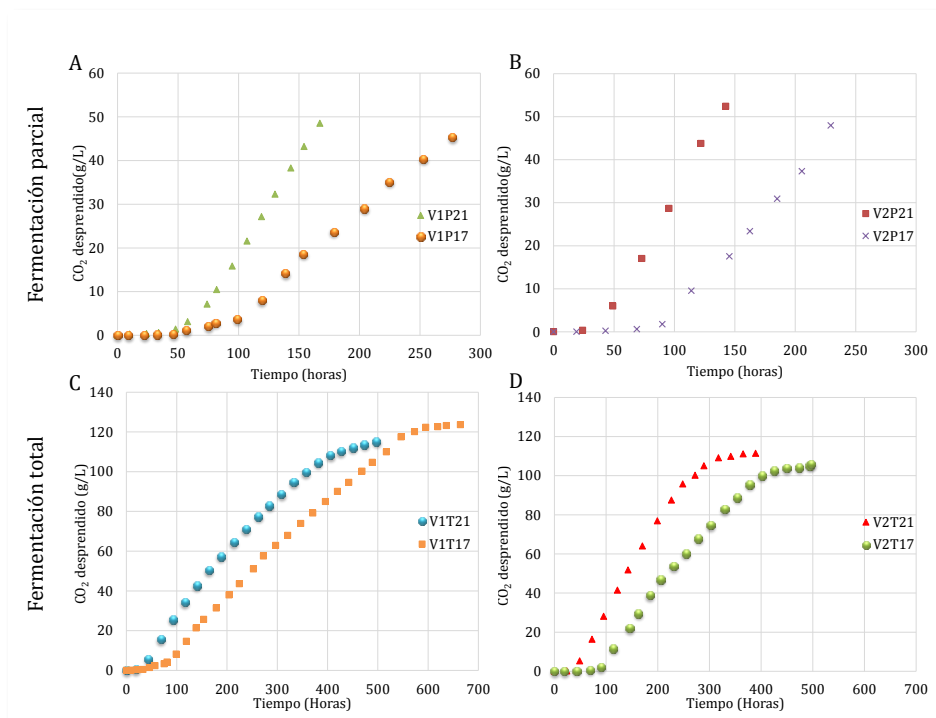


Figura 4.4. Curvas de fermentación de los vinos 1 (A y C) y vinos 2 (B y D).

Como puede observarse, la velocidad de fermentación aumentó con la temperatura, alcanzando el grado alcohólico deseado en un menor tiempo a 21 °C que a 17 °C. En el proceso de fermentación de los vinos 1 el tiempo se redujo en un 40 % aproximadamente a 21 °C respecto de 17 °C, mientras que en los vinos 2 el tiempo se redujo aproximadamente un 38% a la mayor temperatura. Además, se puede observar una diferencia en la fase de latencia del proceso fermentativo, este es un periodo donde las levaduras se multiplican, respirando sin fermentar. Es un periodo de saturación del medio en CO₂, siendo su duración muy dependiente de la temperatura, disminuyendo el tiempo de esta etapa al aumentar la temperatura y siendo esta diferencia más evidente en los vinos 2.

3.3. Desarrollo de la fermentación e influencia del tipo de fermentación en la composición de los vinos

La fermentación alcohólica es la etapa más importante para la elaboración de una bebida alcohólica de calidad (Yang et al., 2012). Este paso se ve afectado por diversos factores como son la temperatura, la cantidad de nutrientes en el medio, los azúcares presentes, el pH, el tamaño del inóculo, etc (Liu et al., 2014; Agu et al; 2008).

3.3.1. Parámetros generales

Cómo se ha comentado anteriormente, en la elaboración de los vinos se controlan algunos parámetros con el fin de evaluar el proceso de fermentación. La Tabla 4.7 muestra los valores de pH obtenidos en los vinos elaborados. En relación al pH se puede observar que los vinos elaborados presentaron en general una disminución del pH respecto del zumo inicial, siendo más acusada en los vinos 2. En los vinos 1 mayor tiempo de fermentación produjo una mayor disminución, al igual que en los vinos 2 fermentados a 17 °C, sin embargo a 21 °C, el pH de los vinos 2 fermentado totalmente fue mayor que el que fermentó parcialmente.

Tabla 4.7. Valores de pH (media y desviación estándar) de los zumos iniciales y vinos 1 y vinos 2.

Temperatura (°C)	Tiempo de fermentación	Vinos 1	Vinos 2
Zumos inicial		2.78±0.006	2.98±0.007
21	Parcial	2.76±0.036	2.64±0.000
	Total	2.60±0.006	2.90±0.006
17	Parcial	2.86±0.000	2.60±0.006
	Total	2.74±0.010	2.43±0.010

La Tabla 4.8 muestra el grado alcohólico final de todos los vinos elaborados y los azúcares reductores residuales que quedaron en los vinos fermentados parcialmente. Los vinos de fermentación total obtuvieron un grado alcohólico natural entre 12.5 y 13.3 y en ningún caso se obtuvo azúcares residuales, por lo que el proceso se realizó correctamente y las levaduras agotaron todos los azúcares. En los vinos fermentados parcialmente, el grado alcohólico obtenido por fermentación fue entre 6.0 y 6.73, posteriormente se añadió alcohol vínico hasta igualar el contenido de los vinos anteriores, por lo que se obtuvieron vinos de la misma graduación aunque en este caso quedaron azúcares sin fermentar, entre 90.3 y 107 g/L.

Tabla 4.8. Grado alcohólico (%v/v) y concentración de azúcares reductores (g/L) (media y desviación estándar) de los vinos 1 y vinos 2.

	Temperatura (°C)	Tiempo de fermentación	Grado alcohólico		Azúcares reductores
			Tras fermentación	Tras encabezado	
Vinos 1	21	Parcial	6.73±0.026	12.7±0.038	92.0±0.000
		Total	12.6±0.064	-	0.000±0.000
	17	Parcial	6.66±0.011	13.1±0.090	107±2.50
		Total	13.3±0.027	-	0.000±0.000
Vinos 2	21	Parcial	6.00±0.164	13.4±0.164	90.3±1.44
		Total	12.5±0.030	-	0.000±0.000
	17	Parcial	6.17±0.053	12.4±0.634	92.0±2.50
		Total	12.7±0.147	-	0.000±0.000

Otro parámetro importante en el proceso de fermentación es la acidez volátil. Este valor se debe controlar durante el proceso de fermentación, debido a que, según el Real Decreto 242/2012 (Orden AAA/2127/2012), *la acidez volátil de los vinos de uva de la campaña, expresada en ácido acético, no podrá superar 0,05 gramos/litro (0,833 miliequivalentes por litro), por cada grado de alcohol adquirido, salvo en el caso de vinos blancos y rosados dulces y semidulces para los que se fija un límite de 1,5 g/l (25 miliequivalentes por litro)*. Los valores de acidez volátil de los vinos elaborados se muestran en la Tabla 4.9. Como se puede observar, los vinos 1 mostraron mayores valores de acidez volátil que los correspondientes vinos 2, aunque en ningún caso supera el límite máximo permitido para vinos de uva, tal y como se ha comentado anteriormente. Esta diferencia entre vinos 1 y 2, puede ser debido a la mayor cantidad de nitrógeno asimilable que poseen los zumos iniciales 2 frente a los de proporción 1. El nitrógeno asimilable es un elemento clave en el crecimiento de la levadura, ya que afecta a la tasa de crecimiento y a la población celular. Por tanto, se podría decir, que la cantidad de nitrógeno asimilable presente en el medio influye en la acidez volátil de la bebida final. Algunos autores han encontrado que en mostos bastante azucarados y enriquecidos con nitrógeno asimilable antes de la fermentación, la acidez volátil era más baja que en aquellos que no estaban enriquecidos (Bely et al., 2005), lo que podría justificar los valores obtenidos. Estos autores afirmaron que la estimulación del crecimiento de las levaduras mediante la adición de nitrógeno asimilable, restringía la producción de acidez volátil (principalmente ácido acético) ya que las levaduras *S. cerevisiae* responden al aumento de la osmolaridad externa por aumento de la producción y acumulación intercelular de glicerol para contrarrestar la presión osmótica.

Tabla 4.9. Acidez volátil (meq/L) (media y desviación estándar) de los vinos 1 y vinos 2.

	Temperatura (°C)	Tiempo de fermentación	Vinos 1	Vinos 2
21		Parcial	7.55±0.284	3.94±0.000
		Total	8.70±0.284	7.39±0.000
17		Parcial	4.93±0.000	3.61±0.284
		Total	7.23±0.284	5.42±0.000

Por otro lado, y comparando el tiempo de fermentación, éste, aumentó el valor de acidez volátil, llegando el vino 2 fermentado totalmente a 21 °C (V2T21) a presentar un valor 1.9 veces mayor que el correspondiente de fermentación parcial. Este aumento de acidez volátil con el tiempo de fermentación se puede deber al mayor tiempo que están actuando las levaduras. El ácido acético es un producto secundario de la fermentación alcohólica, por lo que es lógico pensar que un mayor tiempo de fermentación aumentará el valor de este parámetro.

3.3.2. Compuestos bioactivos

Antocianinas

Las antocianinas suelen ser extraídas en las primeras etapas de la fermentación (Soto Vázquez et al., 2010). Las Tablas 4.10 y 4.11 muestran las concentraciones de antocianinas cuantificadas en los zumos iniciales y los vinos elaborados. Como se puede observar, el tiempo de fermentación influye en el contenido de antocianos monómeros de los vinos. Los vinos que fueron elaborados con un menor tiempo de fermentación presentaron en todos los casos mayores concentraciones de antocianinas que los correspondientes vinos de fermentación total.

Tabla 4.10. Concentración de antocianinas (mg /L) (media y desviación estándar) de los vinos 1.

	Zumo inicial 1	Temperatura 21 °C		Temperatura 17 °C	
		Parcial	Total	Parcial	Total
Delfinidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.642±0.004	4.02±0.047	0.472±0.027	1.51±0.001	0.817±0.098
Cianidín-3- <i>O</i> -galactósido	n.d.	1.07±0.084	0.422±0.006	0.914±0.007	0.610±0.003
Petunidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.650±0.005	4.83±0.041	0.822±0.006	2.60±0.058	1.28±0.083
Peonidín-3- <i>O</i> -galactósido	n.d.	1.18±0.025	0.465±0.031	0.968±0.064	0.685±0.009
Malvidín-3- <i>O</i> -galactósido	5.83±0.047	20.0±0.124	5.80±0.261	13.3±0.453	11.5±0.220
Total galactósidos	7.13±0.056	31.1±0.021	7.98±0.257	19.3±0.466	14.9±0.175
Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	1.31±0.002	3.38±0.011	0.663±0.004	0.985±0.019	1.02±0.039
Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	n.d.	0.938±0.060	0.468±0.034	0.606±0.007	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido	2.95±0.005	11.6±0.035	3.62±0.076	5.59±0.011	4.61±0.077
Total glucósidos	4.26±0.007	16.0±0.038	4.75±0.039	7.18±0.020	5.64±0.047
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.595±0.002	2.30±0.105	0.498±0.022	1.13±0.097	0.642±0.006
Cianidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.801±0.005	4.34±0.012	1.22±0.016	1.67±0.054	1.58±0.038
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.825±0.010	2.63±0.073	0.676±0.030	1.43±0.106	0.934±0.075
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinósido	3.23±0.016	13.4±0.128	4.25±0.181	7.85±0.003	7.44±0.052
Total arabinósidos	5.45±0.030	20.3±0.193	6.15±0.165	10.9±0.160	10.0±0.156
Cianidina	0.559±0.002	0.787±0.025	0.818±0.005	0.641±0.021	0.788±0.003
Petunidina	0.522±0.007	1.76±0.031	0.917±0.043	0.883±0.079	0.857±0.044
Peonidina	0.734±0.343	0.549±0.017	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidina	0.646±0.004	1.48±0.022	0.710±0.013	0.870±0.024	0.608±0.024
Total agliconas	2.46±0.353	3.80±0.006	1.63±0.050	1.76±0.098	1.47±0.067
Peonidín-3-pentósido	n.d.	0.759±0.061	0.546±0.009	0.606±0.006	n.d.
Total antocianos	19.3±0.407	75.1±0.022	22.4±0.013	41.5±0.024	33.3±0.024

Tabla 4.11. Concentración de antocianinas (mg /L) (media y desviación estándar) de los vinos 2.

	Zumo inicial 2	Temperatura 21 °C		Temperatura 17 °C	
		Parcial	Total	Parcial	Total
Delfinidín-3- <i>O</i> -galactósido	1.63±0.124	1.98±0.113	1.68±0.086	3.33±0.145	3.75±0.002
Cianidín-3- <i>O</i> -galactósido	5.14±0.555	0.647±0.010	0.878±0.010	1.54±0.048	1.17±0.002
Petunidín-3- <i>O</i> -galactósido	6.50±0.608	3.12±0.103	2.70±0.201	5.02±0.086	4.05±0.003
Peonidín-3- <i>O</i> -galactósido	2.44±0.224	0.690±0.008	0.964±0.014	1.51±0.035	1.14±0.004
Malvidín-3- <i>O</i> -galactósido	29.3±2.8	21.3±0.656	13.3±0.262	18.6±0.540	18.4±0.051
Total galactósidos	45.0±4.23	27.7±0.694	19.5±0.152	30.0±0.755	28.6±0.058
Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	0.854±0.008	3.13±0.143	1.23±0.065	2.31±0.037	2.44±0.005
Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	1.62±0.092	0.995±0.124	0.837±0.014	1.18±0.035	1.14±0.002
Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido	12.9±1.14	12.0±0.487	6.41±0.593	11.1±0.014	10.8±0.122
Total glucósidos	15.4±1.10	16.1±0.505	8.51±0.542	14.6±0.086	14.3±0.125
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.781±0.055	1.19±0.067	1.10±0.043	2.20±0.027	1.65±0.003
Cianidín-3- <i>O</i> -arabinósido	2.25±0.170	4.65±0.129	2.12±0.128	3.54±0.048	3.65±0.002
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinósido	2.21±0.133	1.80±0.123	1.56±0.066	2.74±0.024	2.12±0.003
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinósido	13.9±1.15	14.4±0.091	12.4±0.625	11.3±0.470	11.6±0.021
Total arabinósidos	19.2±1.26	20.8±0.342	16.1±0.792	17.3±0.494	17.4±0.022
Cianidina	1.50±0.056	1.26±0.184	0.886±0.041	0.823±0.008	0.923±0.003
Petunidina	1.07±0.086	1.79±0.185	1.32±0.036	1.88±0.032	1.63±0.002
Peonidina	0.564±0.016	0.562±0.004	0.596±0.009	0.602±0.016	0.637±0.006
Malvidina	1.94±0.120	1.56±0.017	1.01±0.042	1.74±0.058	1.39±0.003
Total agliconas	5.07±0.059	3.91±0.204	2.93±0.068	4.22±0.104	3.66±0.007
Peonidín-3-pentósido	n.d.	n.d.	0.722±0.003	0.864±0.002	n.d.
Total antocianos	84.6±5.43	71.0±0.017	49.8±0.042	70.1±0.058	66.5±0.003

Se podría pensar que a mayor tiempo de fermentación, mayor extracción de antocianinas desde las pieles del fruto hacia el vino. Sin embargo, los antocianos participan en multitud de reacciones como son los equilibrios en función del pH, las reacciones de copigmentación, reacciones de degradación, reacciones de formación de piranoantocianos y reacciones entre antocianos y taninos. Además, esta pérdida de antocianinas puede ser ocasionada por la generación de alcohol durante el proceso de fermentación. Un aumento en el grado alcohólico puede ocasionar alteraciones en las uniones de los productos resultantes de la copigmentación, ya que puede producir un decrecimiento en el contenido de antocianinas, resultado de su fijación en las partes sólidas, reacciones de degradación y cambios estructurales (Soto Vázquez et al., 2010); siendo esta última debida a la formación de pigmentos poliméricos con taninos.

La Figura 4.5 muestra la concentración total de derivados galactósidos de las antocianidinas de los vinos 1 y 2. En la Figura se observa que en todos los casos, los vinos V1 presentaron mayor concentración de derivados galactósidos que los sus zumos de partida, sin embargo en el caso de los vinos V2, la concentración de estos compuestos disminuyó con el proceso de fermentación.

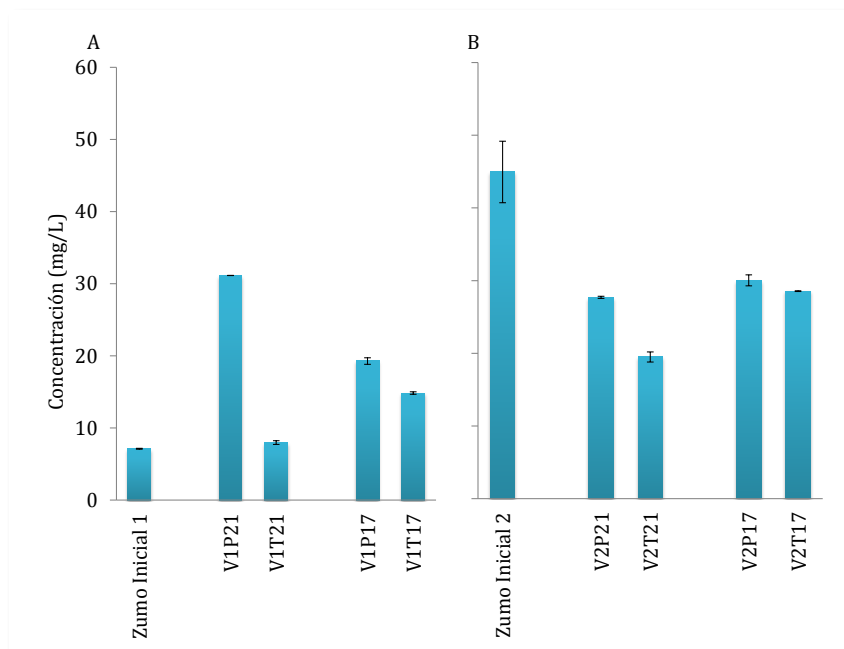


Figura 4.5. Concentración de derivados galactósidos (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

En relación al tiempo que duró el proceso, los vinos de fermentación total contenían menos derivados que sus correspondientes vinos fermentados parcialmente. En estos últimos, si se comparan los de temperatura de 21 grados V1 y V2, la diferencia en contenido de derivados galactósidos fue pequeña (33.1 y 27.7 mg/L, respectivamente), siendo el vino V1 el que presentó mayor cantidad de estos compuestos. Este último vino fue el que más diferencia presentó con su correspondiente vino de fermentación total, ya que presentó casi 4 veces más concentración de derivados galactósidos. Sin embargo, en el caso de los vinos V1P17 y V2P17, el vino V2 mostró mayor concentración de estos compuestos (64% más que V1P17). En cuanto a los vinos obtenidos a 17 grados, la diferencia no fue tan grande, pudiéndose comprobar que los vinos 1 obtenidos por fermentación parcial y total difirieron en un 19.3% y en el caso de los vinos 2 en un 10% de compuestos galactósidos.

La Figura 4.6 muestra la concentración total de derivados arabinósidos de los vinos 1 y 2. Se puede ver qué, cómo en el caso de los galactósidos, los vinos de fermentación parcial presentaron mayor concentración de esta familia que los de fermentación total, excepto en el vino V2P17 y V2T17, en los que no hubo prácticamente diferencia entre concentraciones. En el caso de los vinos V1, la concentración de derivados arabinósidos siempre fue mayor que la del zumo inicial 1 (5.5 mg/L), no siendo de esta forma en los vinos V2, donde todos los vinos presentaron menor contenido en estos compuestos respecto del zumo inicial 2 (19.2 mg/L), excepto en el caso del vino V2P21 (20.8 mg/L). En la Figura 4.6A, se puede ver que en el vino 1 fermentado a 21 °C, la fermentación total provocó un descenso de más de la mitad de derivados arabinósidos. Sin embargo, en el mismo tipo de vino pero de proporción 2 (Figura 4.6B), la diferencia en contenido de arabinósidos respecto del vino de fermentación total, fue del 22.6%.

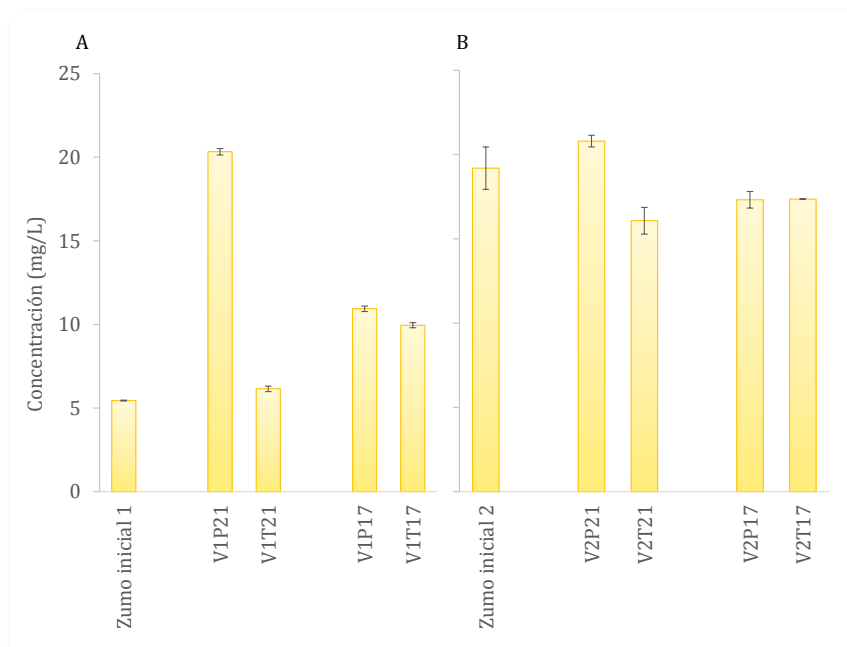


Figura 4.6. Concentración de derivados arabinósidos (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

Por otro lado, si se comparan las fermentaciones totales y parciales de los vinos a 17 grados y ambas proporciones usadas, se comprobó que la diferencia en contenido de esta familia no fue tan grande, siendo la diferencia de concentración en esta familia de compuestos entre un 0.05-1%.

La Figura 4.7 muestra la concentración de la tercera familia mayoritaria en los vinos obtenidos, es decir, los derivados glucósidos de antocianinas.

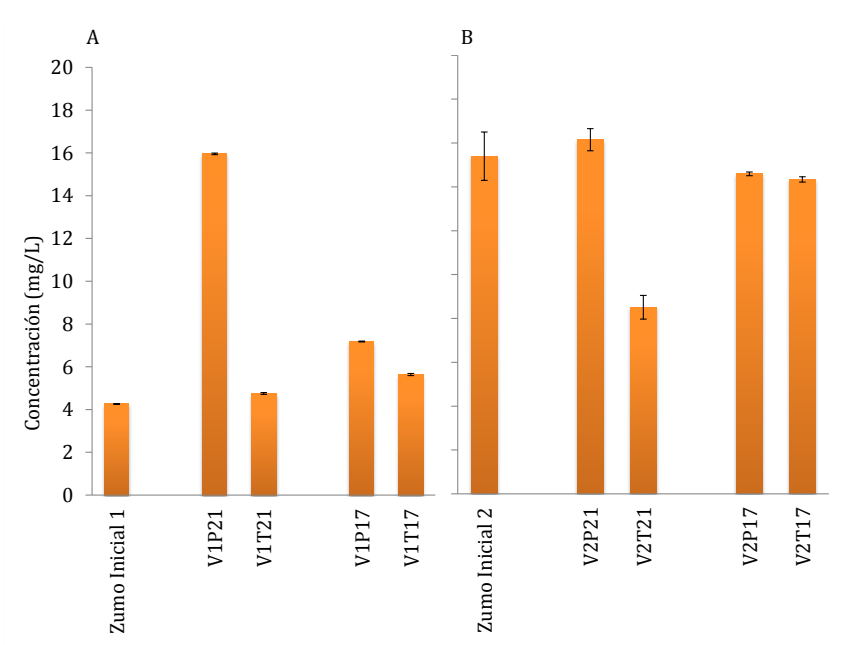


Figura 4.7. Concentración de derivados glucósidos (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

De igual forma que las familias anteriores los vinos de fermentación parcial presentaron mayor concentración de glucósidos que los de fermentación total. Además, tampoco se vio mucha diferencia en concentración de esta familia de compuestos en los vinos de 17 grados, sobre todo en los vinos V2. En el caso del vino V1P17, obtuvo un 21.5% más que el vino de fermentación total, siendo esta diferencia de concentración del 2% en el caso de los vinos V2. El vino V1P21 fue superior en concentración al vino V1T21 en contenido de glucósidos, teniendo V1P21 más del doble de concentración que su respectivo vino de fermentación total (V1T21). En el caso del vino V2P21, la diferencia fue mayor que en los anteriores (galactósidos y arabinósidos), alcanzando un incremento en contenido de casi el doble de concentración respecto del vino obtenido en las mismas condiciones pero de fermentación total.

Las antocianidinas o agliconas identificadas y cuantificadas, se muestran en la Figura 4.8. Se puede observar, que las antocianidinas fueron inferiores a su respectivo zumo inicial en todos los casos, excepto en el vino V1P21. Además, al igual que las demás familias de compuestos comentadas anteriormente, estas fueron superiores en los vinos de fermentación parcial.

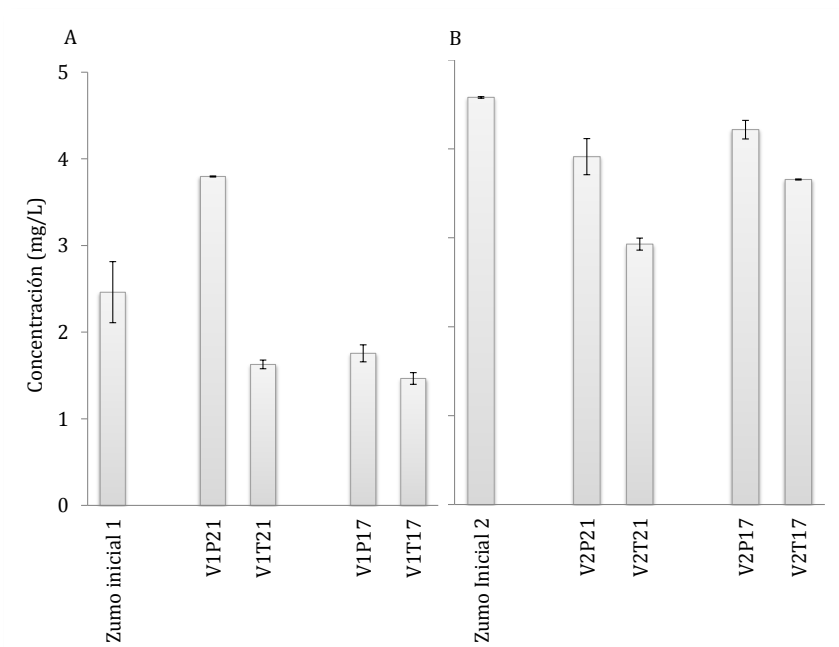


Figura 4.8. Concentración de antocianidinas (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

Los resultados están de acuerdo con lo registrado por otros autores en relación a la variación de antocianinas durante el proceso de fermentación (Rommel et al., 1992; Czyzowska and Pogorzelski 2004; Amidzic-Klaric et al., 2011; Arozarena et al., 2012; Ortiz et al., 2013), debido a reacciones secundarias durante la fermentación como pueden ser la copigmentación (Boulton, 2001); la formación de pironoantocianos (De Freitas and Mateus, 2011), que son compuestos poco sensibles a la decoloración del SO_2 (Morata et al., 2006); reacciones con taninos (Ribéreau-Gayon et al., 1998); reacciones de dimerización de antocianos (Vidal et al., 2004; Salas et al., 2005; Alcalde-Eon et al., 2007; Pati et al., 2009) etc. Además, algunos autores han confirmado también que una parte de las antocianinas, debido a su polaridad, quedan absorbidas en las levaduras entre un 2-6% del total de los antocianos dependiendo de la levadura (Morata et al., 2006).

La disminución de todos los compuestos individuales se puede ver de forma más clara en los cromatogramas que se muestran en la Figura 4.9.

Como conclusión, se puede afirmar que el tiempo de fermentación influye en la composición de antocianinas de los diferentes vinos. Los vinos elaborados con un menor tiempo de fermentación, es decir los de fermentación parcial, presentaron en todos los casos, mayor concentración de estos compuestos que los vinos de fermentación más larga o total.

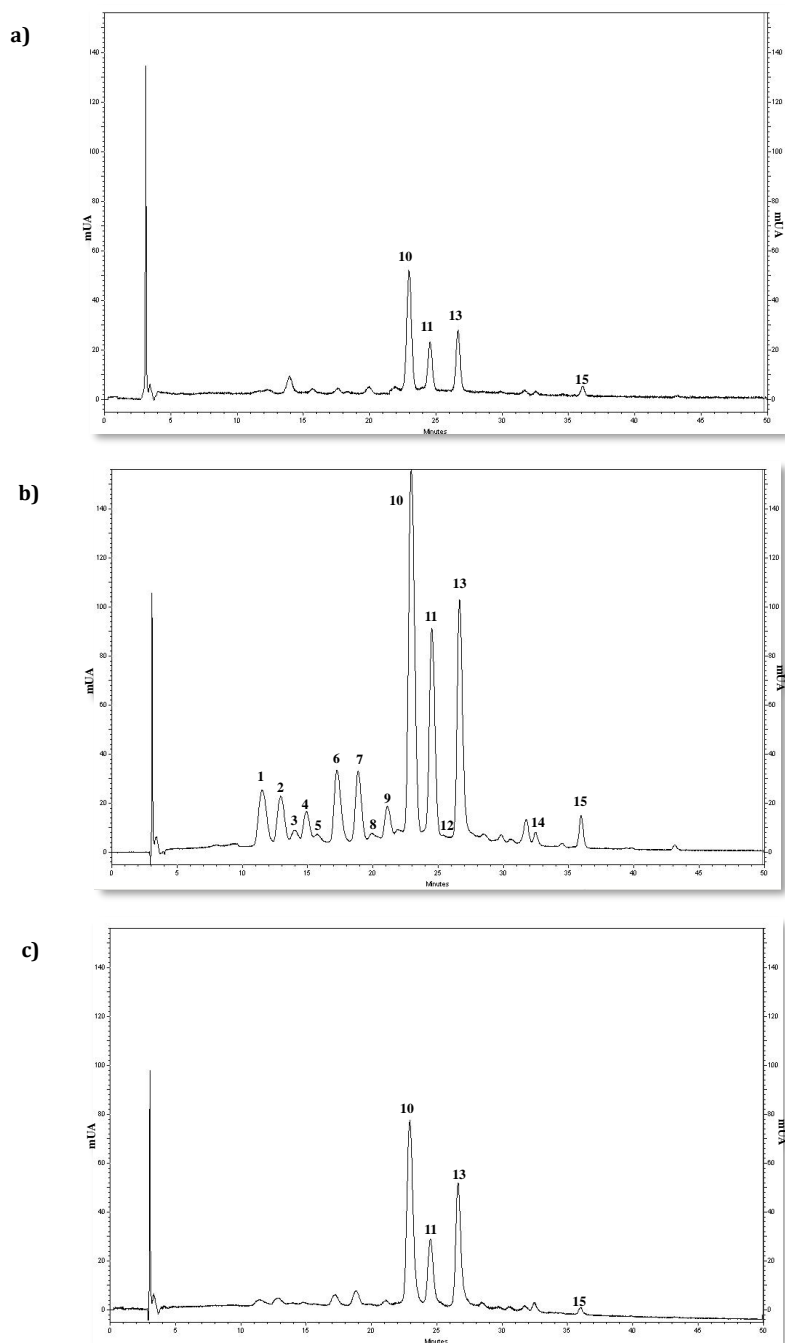


Figura 4.9. Cromatogramas de la fracción de antocianinas correspondientes al zumo inicial 1 (a), vino V1P21 (b) y vino V1T21 (c).

Antocianinas: 1. Dp-3-gal: Delfinidín-3-*O*-galactósido; 3. Cn-3-gal: Cianidín-3-*O*-galactósido; 6. Pt-3-gal: Petunidín-3-*O*-galactósido; 8. Pn-3-gal: Peonidín-3-*O*-galactósido; 10. Mv-3-gal: Malvidín-3-*O*-galactósido; 2. Dp-3-glc: Delfinidín-3-*O*-glucósido; 5. Cn-3-glc: Cianidín-3-*O*-glucósido; 12. Pn-3-pentosido: Peonidín-3-pentósido; 11. Mv-3-glc: Malvidín-3-*O*-glucósido; 4. Dp-3-arb: Delfinidín-3-*O*-arabinósido; 7. Cn-3-arb: Cianidín-3-*O*-arabinósido; 9. Pt-3-arb: Petunidín-3-*O*-arabinósido; Pn-3-arb: Peonidín-3-*O*-arabinósido; 13. Mv-3-arb: Malvidín-3-*O*-arabinósido; 14. Pn: Peonidina; 15. Mv: Malvidina

Derivados del flavan-3-ol

En relación a los derivados de flavan-3-ol, se pudieron cuantificar 6 compuestos diferentes. Las Tablas 4.12 y 4.13 muestran las concentraciones de estos compuestos en los zumos iniciales y los vinos elaborados. Como se puede apreciar, el compuesto mayoritario en todos los casos fue el epigallocatequín-3-*O*-galato, excepto en el zumo inicial 2. Además, la concentración de derivados de flavan-3-ol de los vinos fue superior a los zumos iniciales. Las mayores diferencias entre vinos a igualdad de temperatura, se encontró en los vinos V2 elaborados a 21 °C, donde en el vino de fermentación parcial se identificó la epicatequina, pero no estuvo presente en el vino de fermentación total. Los vinos que mayor concentración de estos compuestos presentaron fueron los V1P y V2P obtenidos a 21°C, ambos con concentración similar. El dímero B2, no se pudo identificar en el zumo inicial 1 ni en el vino V1P21.

Tabla 4.12. Concentración de compuestos derivados del flavan-3-ol (mg/L) (media y desviación estándar) de los vinos 1.

	Temperatura 21 °C			Temperatura 17 °C	
	Zumo inicial 1	Parcial	Total	Parcial	Total
Epigallocatequín-3- <i>O</i> -galato	3.15±0.008	13.4±0.222	8.85±0.026	7.37±0.553	7.71±0.329
Epigallocatequina	0.918±0.084	3.04±0.100	3.40±0.196	0.931±0.019	2.83±0.055
Procianidina B1	1.10±0.074	2.15±0.133	1.26±0.185	1.40±0.096	1.13±0.036
(+)-Catequina	2.74±0.036	10.5±0.260	6.40±0.205	6.80±0.611	6.63±0.319
Procianidina B2	n.d.	n.d.	1.14±0.058	0.710±0.031	1.31±0.157
(-)-Epicatequina	0.364±0.019	1.54±0.040	1.41±0.234	1.07±0.054	1.22±0.014
Total flavan-3-ol	8.27±0.161	30.7±0.258	22.5±0.083	18.3±0.686	20.8±0.267

Tabla 4.13. Concentración de compuestos derivados del flavan-3-ol (mg/L) (media y desviación estándar) de los vinos 2.

	Temperatura 21 °C			Temperatura 17 °C	
	Zumo inicial 2	Parcial	Total	Parcial	Total
Epigallocatequín-3- <i>O</i> -galato	7.51±0.071	12.7±0.309	8.88±0.115	12.8±0.648	10.3±0.023
Epigallocatequina	0.917±0.185	2.54±0.476	3.89±0.279	n.d.	1.66±0.096
Procianidina B1	0.156±0.022	2.59±0.148	1.90±0.104	1.86±0.228	2.60±0.150
(+)-Catequina	10.9±0.408	10.2±0.239	7.71±0.691	8.72±0.105	8.04±0.320
Procianidina B2	1.37±0.094	1.41±0.002	1.82±0.187	1.44±0.102	1.81±0.079
(-)-Epicatequina	0.723±0.063	1.22±0.124	n.d.	1.00±0.018	1.00±0.056
Total flavan-3-ol	21.6±0.264	30.6±0.774	24.2±0.407	25.9±0.427	25.4±0.673

En relación al total de esta familia, la Figura 4.10 muestra las concentraciones obtenidas tanto en los zumos iniciales como en todos los vinos elaborados. Las bebidas se vieron afectadas por el tiempo de fermentación, en tanto que los vinos de fermentación parcial presentaron en todos los casos mayor concentración de estos compuestos que las bebidas que se dejaron fermentar totalmente, excepto en los vinos V1 fermentados a 17°C, donde el vino que fermentó completamente

(V1T17), presentó una concentración ligeramente superior al que se le paró la fermentación (V1P17).

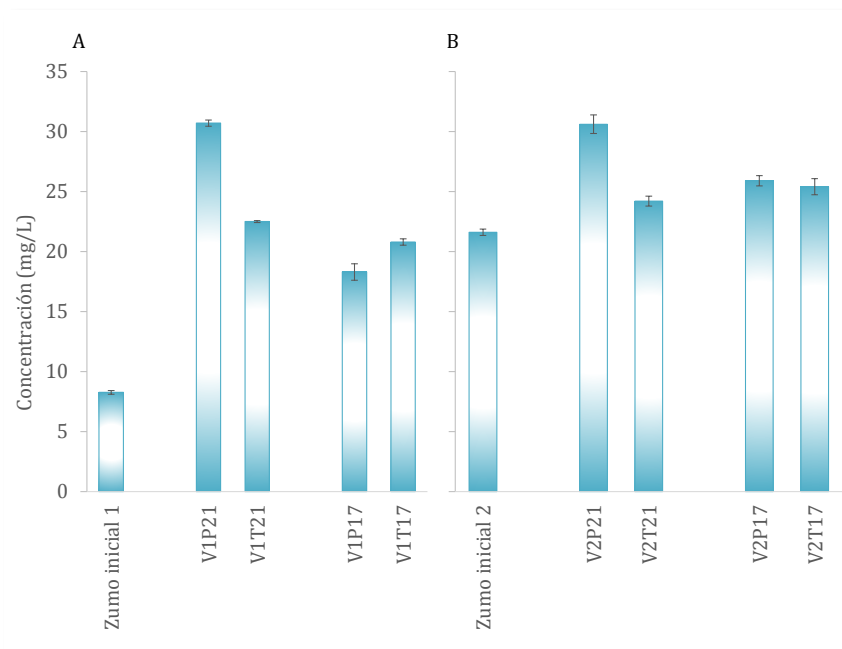


Figura 4.10. Concentración de derivados del flavan-3-ol (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

Flavonoles

La Tablas 4.14 y 4.15 muestran las concentraciones de flavonoles obtenidas en todos los vinos elaborados. Como se puede observar en total se identificaron cuatro compuestos, los derivados glucósido y glucurónido de quercetina y kaempferol, siendo el mayoritario en todos los casos quercetin-3-*O*-glucurónido. Este compuesto disminuyó su concentración durante el proceso de fermentación en todos los casos. El resto de compuestos aumentaron o permanecieron con pocas modificaciones durante el proceso de fermentación.

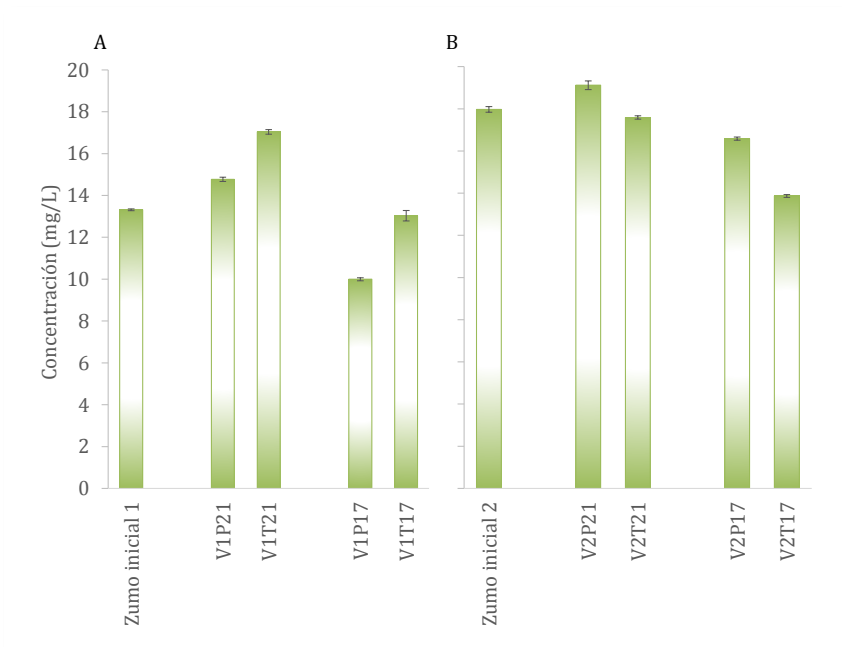
Tabla 4.14. Concentración de flavonoles (mg/L) (media y desviación estándar) de los vinos 1.

	Temperatura 21 °C			Temperatura 17 °C	
	Zumo inicial 1	Parcial	Total	Parcial	Total
Quercetín-3- <i>O</i> -glucósido	0.808±0.017	1.58±0.039	1.65±0.015	1.08±0.017	1.11±0.023
Quercetín-3- <i>O</i> -glucurónido	7.13±0.004	5.23±0.029	6.18±0.060	4.57±0.027	5.23±0.109
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	3.14±0.015	4.60±0.003	5.34±0.044	2.45±0.011	3.68±0.074
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucurónido	2.23±0.017	3.36±0.032	3.87±0.025	1.89±0.019	3.01±0.043
Total flavonoles	13.3±0.043	14.8±0.100	17.0±0.114	10.0±0.072	13.0±0.246

Tabla 4.15. Concentración de flavonoles (mg/L) (media y desviación estándar) de los vinos 2.

	Temperatura 21 °C			Temperatura 17 °C	
	Zumo inicial 2	Parcial	Total	Parcial	Total
Quercetin-3-O-glucósido	1.99±0.080	2.29±0.061	1.80±0.023	1.45±0.008	1.23±0.004
Quercetin-3-O-glucurónido	8.94±0.048	7.93±0.057	6.33±0.011	6.52±0.031	6.18±0.022
Kaempferol-3-O-glucósido	3.91±0.024	4.67±0.315	5.09±0.022	4.95±0.014	3.48±0.005
Kaempferol-3-O-glucurónido	3.13±0.017	4.22±0.011	4.37±0.026	3.67±0.025	2.98±0.041
Total flavonoles	18.0±0.135	19.1±0.208	17.6±0.081	16.6±0.077	13.9±0.068

La Figura 4.11 muestra la concentración total de esta familia en los zumos iniciales y vinos obtenidos. Como se puede observar, los vinos 1 que completaron su fermentación presentaron mayor concentración de flavonoles que los correspondientes de fermentación parcial. En los vinos V2, la concentración de flavonoles fue menor en aquellos vinos que completaron la fermentación alcohólica.

**Figura 4.11.** Concentración de flavonoles (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

Taninos totales

La Figura 4.12 muestra la concentración de taninos totales en los vinos de arándanos elaborados. Se puede comprobar que el proceso de fermentación redujo el contenido de taninos, siendo el decrecimiento mayor al aumentar el tiempo de fermentación, llegándose a reducir la concentración respecto del zumo inicial entre un 26.0 y 98.5%, en los vinos 1 y entre un 49.0-96.8% en los vinos 2.

De todos los vinos, el vino V1P21 fue el que mayor cantidad de taninos totales presentó.

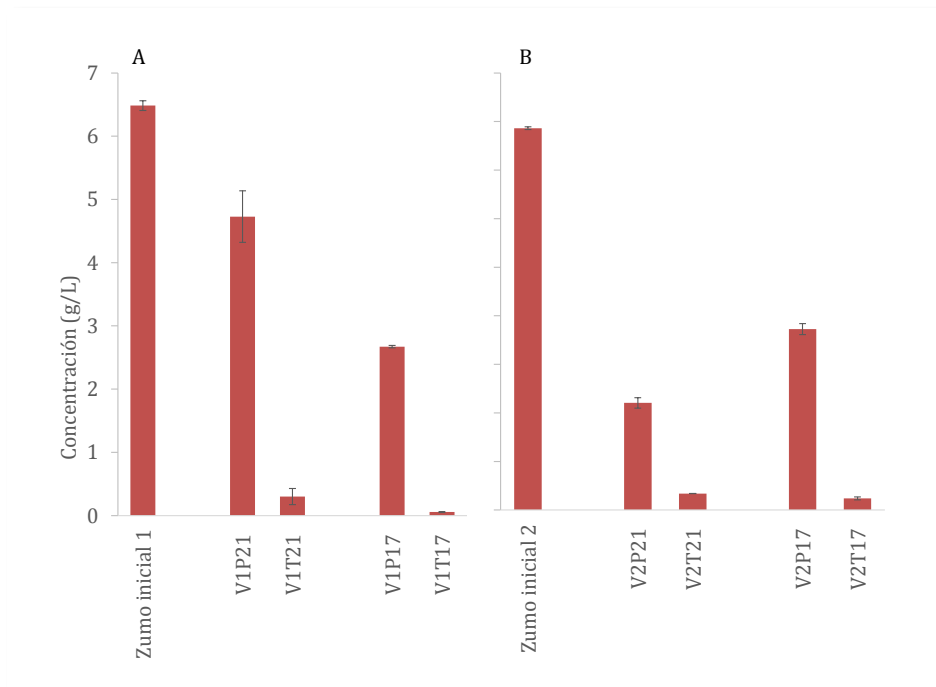


Figura 4.12. Concentración de taninos totales (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

Esta disminución durante el periodo de fermentación puede deberse a que los taninos pueden participar en numerosas reacciones de oxidación, condensación o polimerización que dan lugar a la precipitación de los mismos (Ho et al., 2001). Estos compuestos, en medio ácido como el del vino, forman un carbocatión que podría reaccionar con sitios nucleófilos, como son las posiciones 6 y 8 de los antocianos en forma de carbinol (reacción de condensación tanino-antociano). Como resultado a lo anterior, se forman compuestos incoloros, que con la deshidratación de la molécula, pasan a formarse formas poliméricas que contribuyen al color rojo-anaranjado del vino (Salas et al., 2003; He et al., 2008; Nave et al., 2010). Esta reacción de condensación se ve favorecida por ambientes reductores (como lo es el ambiente de la fermentación) con lo que esta reacción podría explicar el decrecimiento de los taninos, cuando el tiempo de fermentación aumentó. Por otro lado, los taninos presentan posiciones negativas que pueden reaccionar con los antocianos en su forma catiónica, formando un compuesto flaveno incoloro (Santos-Buelga et al., 1999). El aducto formado puede oxidarse a flavilio de color rojo, en presencia de oxígeno (Mateus et al., 2002; Pati et al., 2006) y se establece un equilibrio entre ambas formas, siendo la forma flavilio resistente al SO_2 .

Vitamina C

Los arándanos son conocidos por contener vitamina C, que es un compuesto no fenólico que proporciona numerosos beneficios al organismo humano. Este hecho hace que las bebidas obtenidas, presenten un valor añadido, debido a que los humanos no son capaces de sintetizar ácido L-ascórbico ni su forma oxidada (ácido dehidroascórbico), pero ambos representan un componente esencial en la dieta (Cocetta et al; 2012).

La Figura 4.13 muestra la concentración de vitamina C en los vinos elaborados. Como se puede observar, tanto en los vinos 1 como en los vinos 2 se produjo una disminución de esta vitamina en el proceso de fermentación. Además se pudo comprobar que en el zumo inicial, la proporción de ácido dehidroascórbico fue superior a la del ácido L-ascórbico, mientras que durante la fermentación, toda la vitamina se encontraba en su forma reducida, debido al ambiente reductor que originan las levaduras.

Todos los vinos fermentados totalmente presentaron concentraciones de esta vitamina superior a los respectivos vinos fermentados parcialmente, aunque las diferencias no fueron muy grandes.

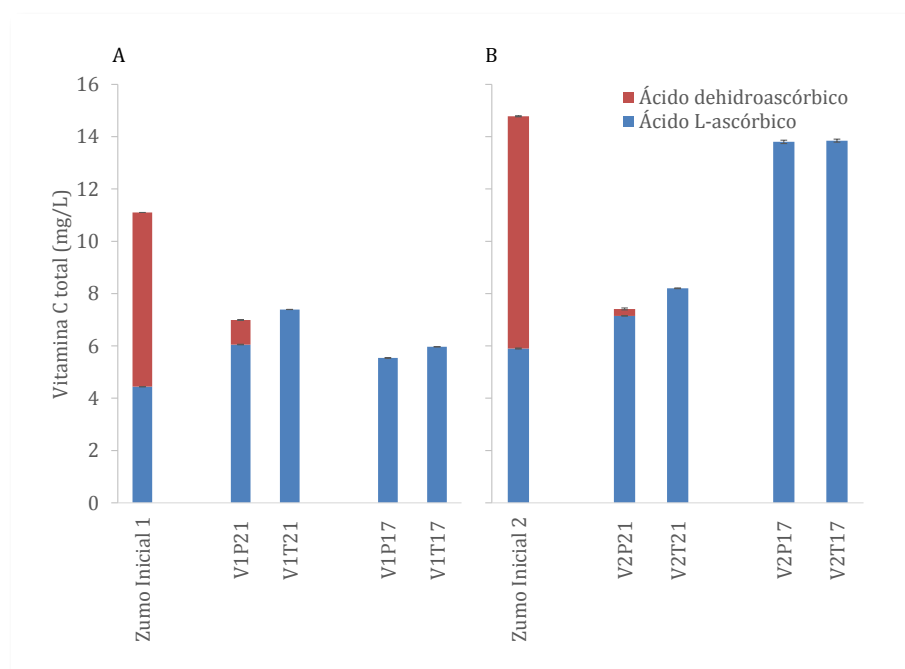


Figura 4.13. Concentración de vitamina C total (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

3.3.3. Actividad antioxidante

La Figura 4.14 muestra los valores de actividad antioxidante de los vinos elaborados. En general se puede observar que el proceso de fermentación aumentó los valores de actividad antioxidante, siendo el aumento mayor en los vinos fermentados parcialmente. Sólo el vino V2T17 obtuvo un valor más bajo que su respectivo zumo inicial. Por otro lado, los vinos V1 y V2 obtenidos a 21°C, mostraron mayores valores que los de menor temperatura. Estos hechos pueden relacionarse con la mayor cantidad de compuestos antioxidantes presentes en estas bebidas, como se ha visto en los apartados anteriores. Arozarena et al. (2012) afirmaron que los vinos de mora (*Rubus glaucus Benth.*) obtenidos con menor ratio agua/fruta fueron los que mayor actividad antioxidante y más coloreados fueron, al igual que ocurre en este estudio.

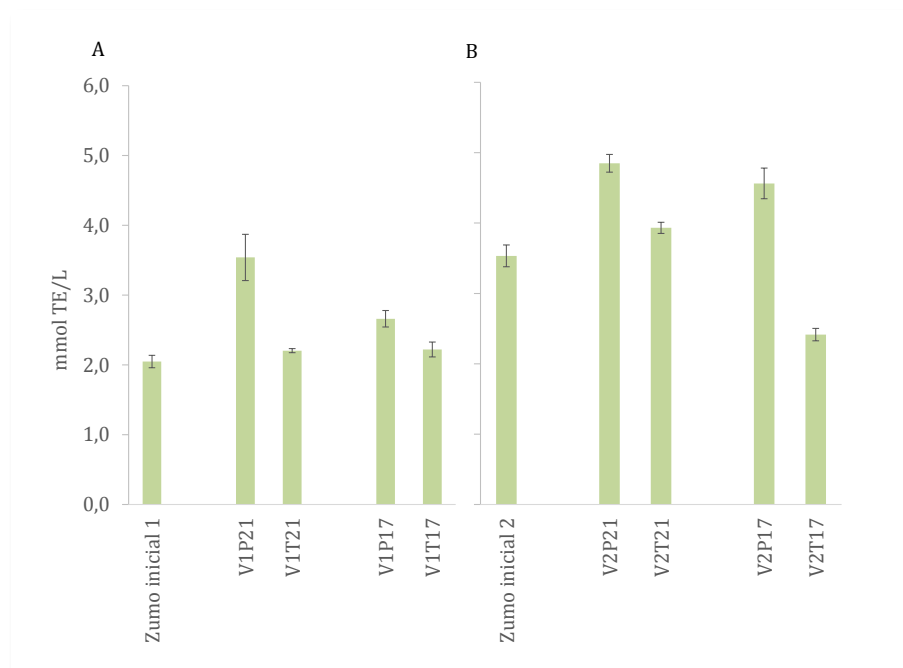


Figura 4.14. Actividad antioxidante (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

Otros autores han medido la actividad antioxidante por el método del DPPH (Santos et al., 2016; Zhang et al., 2016), en vinos de arándanos tratados con carbonato cálcico y chaptalizados, obteniendo valores entre 3-7 mmol Trolox Eq/L (Santos et al., 2016), según el tratamiento de cada vino. En este estudio los valores oscilaron entre 2-4.9 mmol Trolox Eq/L, datos que se encuentran dentro del mismo rango de magnitud que los obtenidos en este estudio. Algunos autores han encontrado que la concentración de antocianinas y de taninos en vinos de arándanos eran las variables que más afectaban a los valores de actividad antioxidante (Zhang et al., 2016).

3.3.4. Color

El color es uno de los atributos más importantes en los vinos tintos. Los compuestos responsables del mismo son las antocianinas y sus derivados formados o extraídos durante el proceso de vinificación (He et al., 2012). Durante el proceso fermentativo de los vinos, las antocianinas y otros compuestos fenólicos, como los flavonoles, participan en reacciones que dan lugar a cambios en el color de la bebida (Ho et al., 2001; Liao et al., 1992), siendo estos compuestos responsables de la calidad del color del vino de frutas final (Zhang et al., 2016). Por ello, se midieron algunos parámetros del color, como son las absorbancias 420 y 520 nm y el color de los pigmentos poliméricos.

Absorbancias a 520 y 420 nm

La Figura 4.15 muestra los valores de las absorbancias a 420 y 520 nm del zumo inicial y de los vinos obtenidos. Como se puede observar en los vinos de fermentación parcial, en general, el proceso de fermentación produjo un aumento inicial de ambas absorbancias, disminuyendo posteriormente los valores en los vinos de fermentación total. Sin embargo en los vinos 2 elaborados a 17 °C se obtuvieron valores muy bajos de ambas absorbancias.

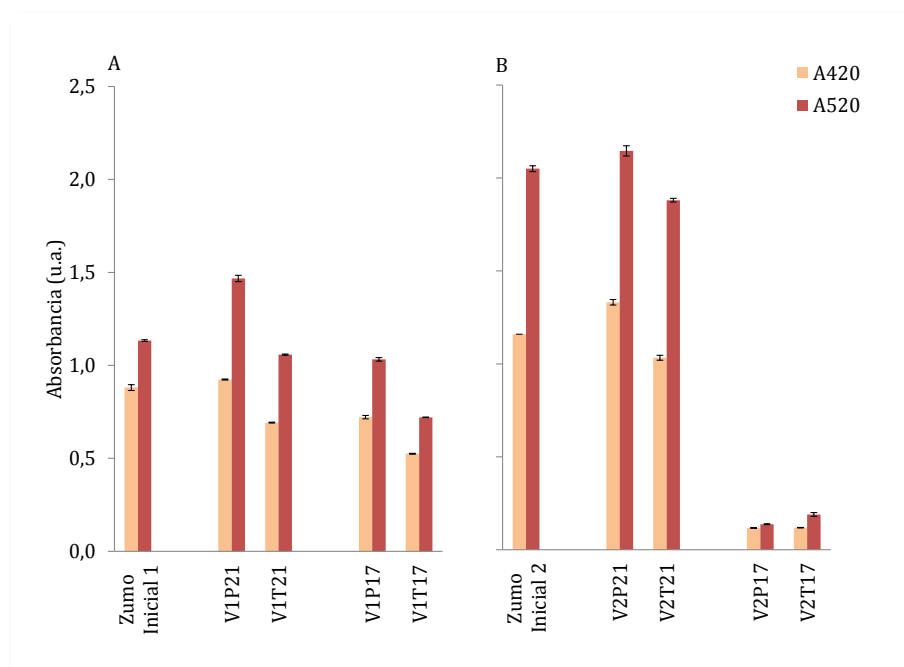


Figura 4.15. Absorbancia a 420 y 520 nm (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

La tonalidad (A_{420}/A_{520}) nos da una idea de la contribución de los tonos rojos en relación a los tonos pardos de los vinos. Con esta relación, podemos saber si un vino es más rojo que pardo, según si el valor resultante es mayor o menor que 1. De este modo se calcularon los valores de tonalidad en los zumos iniciales y los vinos elaborados como se muestra en la Figura 4.16. Como se puede observar en todos los casos los valores de tonalidad permanecieron por debajo de 1, lo que

indica que los tonos rojos superaron a los tonos pardos. En los vinos 1 se produjo un descenso en los valores de tonalidad durante el inicio del proceso fermentativo, como se puede observar en los vinos fermentados parcialmente, para aumentar ligeramente al completar la fermentación, es decir los vinos obtenidos fueron más rojos que el zumo inicial. En los vinos 2, sin embargo, se produjo un aumento de este parámetro durante la fermentación, aumentando al inicio de la fermentación y disminuyendo al completar este proceso.

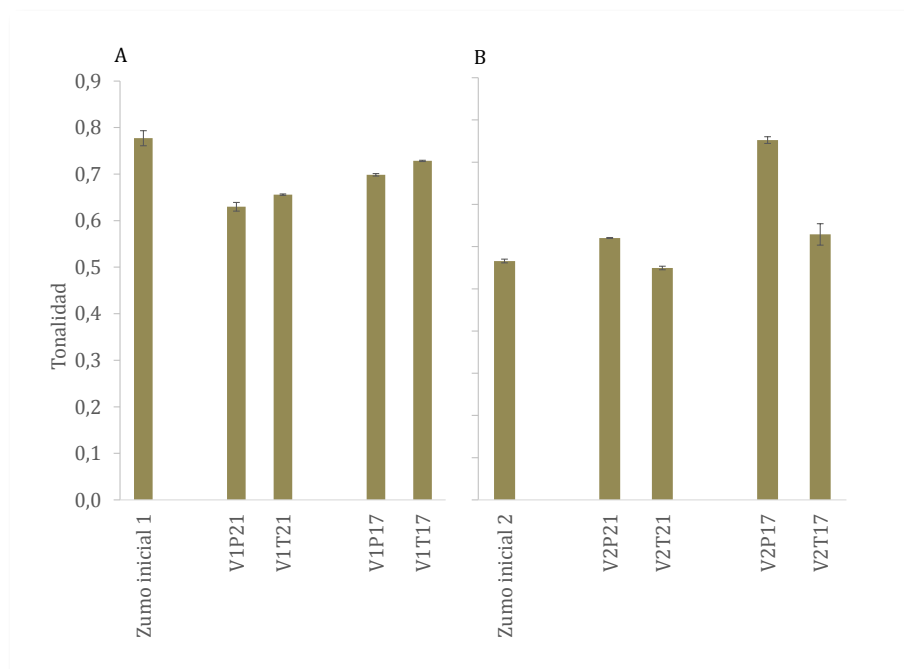


Figura 4.16. Tonalidad (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

Color de pigmentos poliméricos

En relación al color de pigmentos poliméricos, la Figura 4.17 muestra los valores de este parámetro en los zumos iniciales y en los vinos obtenidos. Los zumos iniciales presentaron valores menores de color de pigmentos poliméricos que los vinos obtenidos, viéndose por tanto que conforme avanzó el proceso fermentativo este valor aumentó en todos los casos. Esto puede deberse a reacciones entre compuestos fenólicos que dan lugar a cambios en el color de la bebida, siendo estos cambios debido a la disminución de los antocianos monoméricos y la progresiva formación de pigmentos poliméricos (Gómez-Plaza et al., 2000), como por ejemplo, reacciones de condensación tanino-antociano, que dan lugar a forma poliméricas resistentes al SO_2 , como se ha visto anteriormente.

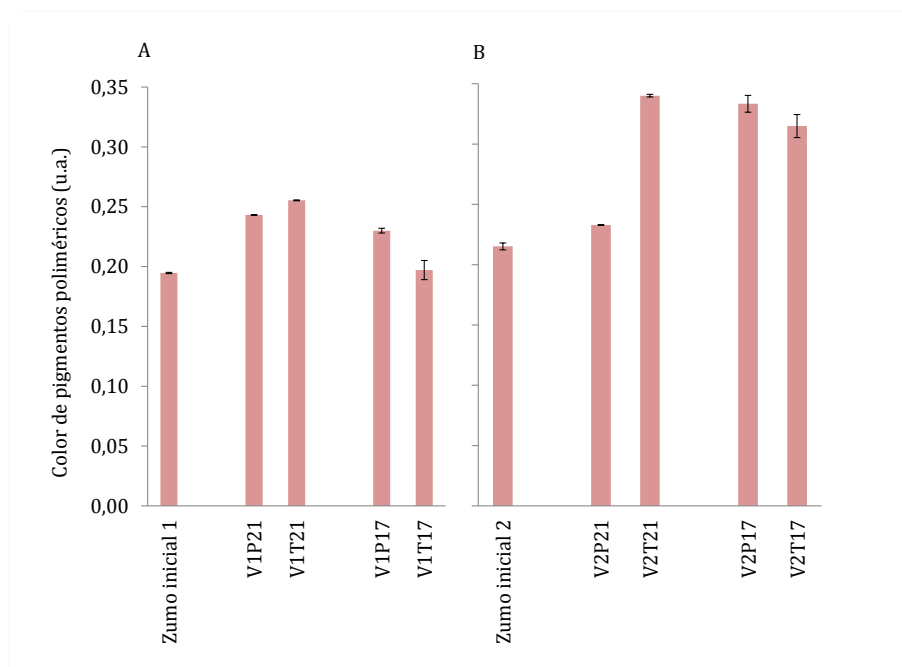


Figura 4.17. Color de pigmentos poliméricos (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

3.4. Influencia de la temperatura de fermentación en la composición de los vinos

Como se ha explicado anteriormente, la temperatura es un parámetro muy influyente en la fermentación alcohólica y en las características de los productos finales. Este parámetro juega un papel muy importante en cuanto a la extracción de compuestos fenólicos desde las pieles del fruto hasta el vino, durante la vinificación. Algunos autores han llegado a afirmar que un incremento en la temperatura de maceración desde 15 a 35 °C puede incrementar el contenido de polifenoles hasta 300 veces (Gómez-Plaza et al., 2000). La temperatura de fermentación no solo afecta al tiempo del proceso y a la concentración final de etanol, sino que puede afectar también las propiedades organolépticas de la bebida (Granadillo et al., 2014). Además, la temperatura de maceración (en este estudio es la misma que la de fermentación) afecta a la concentración de polifenoles presentes en la bebida final (Gómez-Plaza et al., 2000). Por tanto, el control de este factor podría hacer que se mejoraran las características organolépticas y la composición de compuestos bioactivos del producto final que se quiera obtener.

3.4.1. Parámetros generales

La temperatura también es un factor que puede afectar a las características generales de los vinos. La Tabla 4.16 muestra los valores de pH de los vinos obtenidos a ambas temperaturas. Como se puede observar, los vinos 1 fermentados a 17 °C mostraron valores de pH superiores respecto de los fermentados a 21 °C. Sin embargo, en los vinos 2 la tendencia fue contraria, encontrando que los fermentados a 17 °C presentaron menores valores de pH, que aquellos fermentados a 21 °C.

Tabla 4.16. Valores de pH (media y desviación estándar) de vinos 1 y vinos 2.

Tiempo de fermentación	Temperatura (°C)	Vinos 1	Vinos 2
Parcial	21	2.76±0.036	2.64±0.000
	17	2.86±0.000	2.60±0.006
Total	21	2.60±0.006	2.90±0.006
	17	2.74±0.010	2.43±0.010

En relación a la acidez volátil, los valores de este parámetro se muestran en la Tabla 4.17. Como se puede observar, los vinos fermentados a 21 °C mostraron mayores valores de este parámetro respecto de los respectivos fermentados a 17 °C. Este hecho puede ser debido a que la temperatura acelere la velocidad de reacción produciendo mayor cantidad de ácido acético.

Tabla 4.17. Acidez volátil (meq/L) (media y desviación estándar) de vinos 1 y vinos 2.

Tiempo de fermentación	Temperatura (°C)	Vinos 1	Vinos 2
Parcial	21	7.55±0.284	3.94±0.000
	17	4.93±0.000	3.61±0.284
Total	21	8.70±0.284	7.39±0.000
	17	7.23±0.284	5.42±0.000

3.4.2. Compuestos bioactivos

Antocianinas

La temperatura fue un parámetro determinante en la composición de antocianinas (Figura 4.18), debido a que afecta al proceso de extracción de los compuestos desde las partes sólidas del fruto hacia el líquido fermentando.

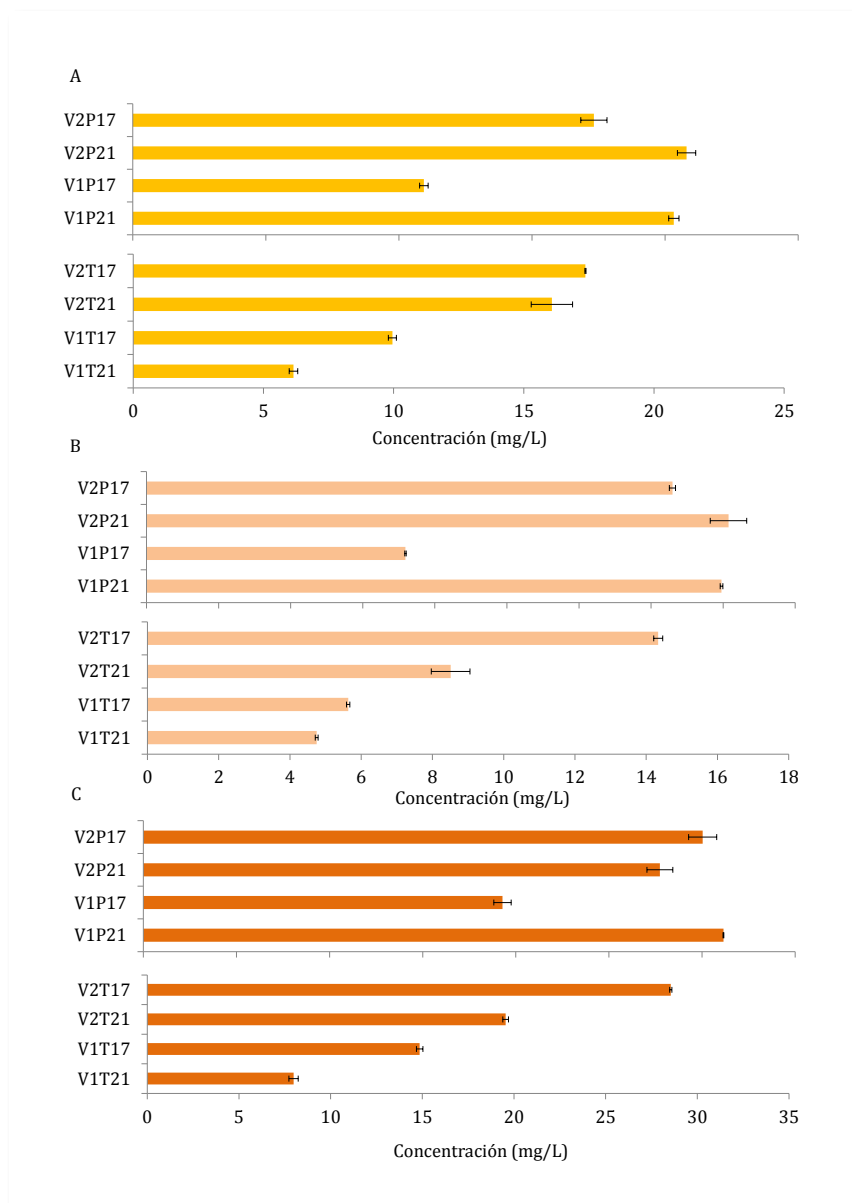


Figura 4.18. Concentración de derivados arabinósidos (A), glucósidos (B) y galactósidos (C) (media y desviación estándar) de antocianinas en los vinos 1 y 2.

Como puede observarse, en los vinos fermentados parcialmente, una mayor temperatura produjo una mayor extracción de todas las familias de derivados de las antocianinas, excepto en los derivados unidos a galactosa de proporción 2, donde la concentración fue mayor a 17 °C. En cuanto a los vinos que se obtuvieron mediante fermentación total, los vinos que se obtuvieron a menor temperatura presentaron mayor cantidad de derivados arabinósidos, glucósidos y galactósidos que los sus respectivos vinos de mayor temperatura. Este hecho podría deberse a una más rápida polimerización de estos compuestos en los vinos elaborados a una mayor temperatura, haciendo que quedasen menos cantidad de derivados monómeros.

Derivados del Flavan-3-ol

La Figura 4.19 muestra las concentraciones totales de los derivados de flavan-3-ol en función de la temperatura de fermentación. Como se puede ver, las bebidas obtenidas a 17°C tanto de los vinos 1 como de los vinos 2, presentaron menor concentración total de esta familia de compuestos flavonoideos, que las que se elaboraron en las mismas condiciones a 21°C.

Con este hecho se puede afirmar que la temperatura también afecta a la concentración de derivados de flavan-3-ol presentes en los vinos, de forma que, a mayor temperatura, las bebidas finales presenten mayor concentración de derivados del flavan-3-ol.

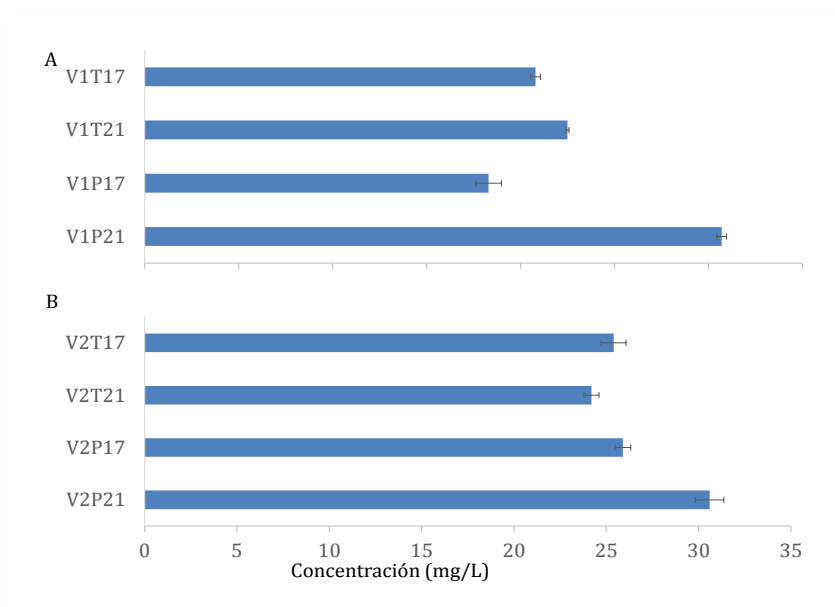


Figura 4.19. Concentración de derivados de flavan-3-ol (media y desviación estándar) de los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

Flavonoles

La temperatura de fermentación afectó a la composición de flavonoles. Como se puede observar en la Figura 4.20, los vinos que se elaboraron a mayor temperatura de fermentación (21°C) de ambas proporciones presentaron mayor concentración de flavonoles que los vinos obtenidos a 17°C, con lo que una temperatura mayor haría posible una mayor extracción de estos compuestos hasta el vino.

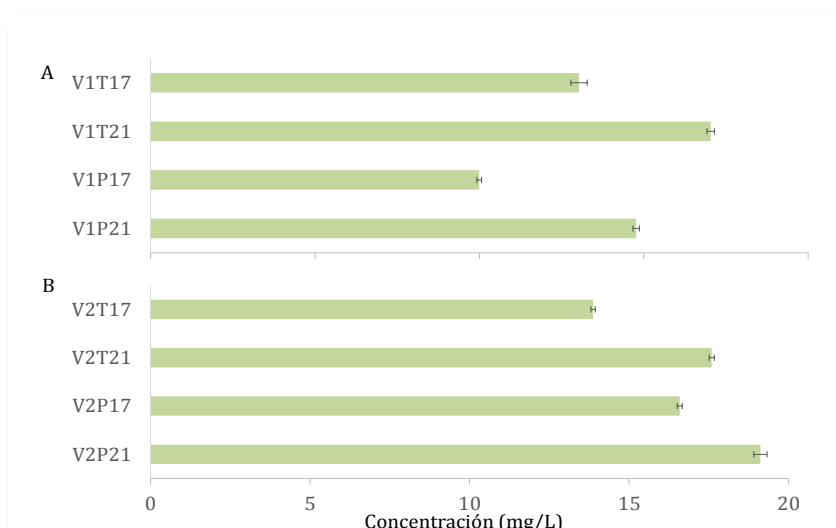


Figura 4.20. Concentración de flavonoles (media y desviación estándar) de los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

Taninos totales

Los taninos son compuestos objeto de estudio ya que presentan numerosos efectos beneficiosos para la salud, debido a su efecto antioxidante en el organismo (Kallio et al., 2014). Estos compuestos son los responsables de la astringencia de los vinos (Cerpa-Calderón et al., 2008) y algunos autores han encontrado proantocianidinas en vinos de arándano (Sanchez-Moreno et al., 2003).

La temperatura influyó en la cantidad de taninos totales presentes en las bebidas. En la Figura 4.21 se muestra que los vinos 1 elaborados a 21 °C mostraron mayor cantidad de taninos totales que los vinos obtenidos a menor temperatura, lo que puede deberse a una mayor extracción de compuestos desde las semillas y la piel hasta el vino. En el caso de los vinos V2, se comprobó que ocurría lo mismo que en el caso anterior, excepto en las bebidas parciales, donde el vino obtenida a 17°C presentó mayor concentración de taninos totales que la de 21°C.

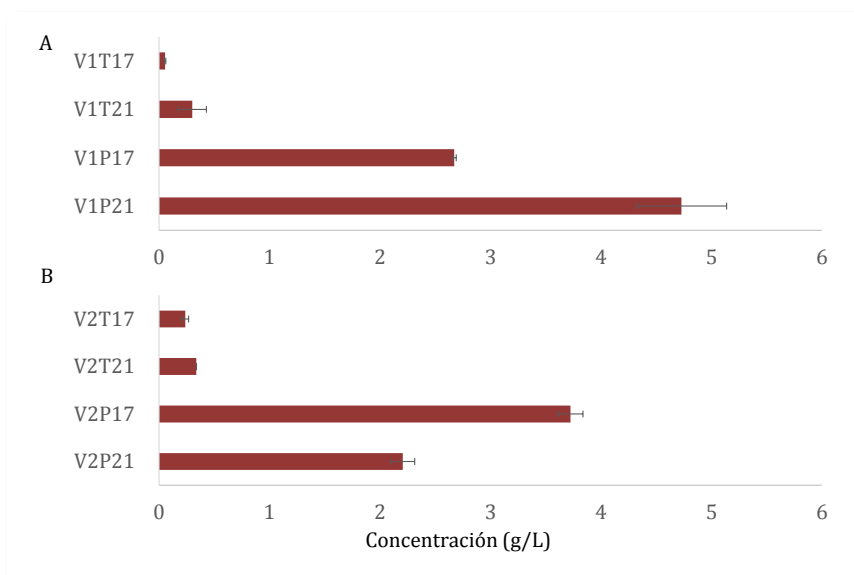


Figura 4.21. Concentración de taninos totales (media y desviación estándar) en los vinos obtenidos.

Vitamina C

La vitamina C es un compuesto que se vio afectado por la temperatura de fermentación como se puede ver en la Figura 4.22. Los vinos 1 obtenidos a mayor temperatura mostraron mayores valores de vitamina, sin embargo en los vinos 2, la mayor temperatura de fermentación produjo vinos con un contenido de vitamina C total, de aproximadamente la mitad que los correspondientes fermentados a 17 °C, siendo estos últimos, los vinos 2 fermentados a 17 °C los que presentaron los mayores contenidos de esta vitamina.

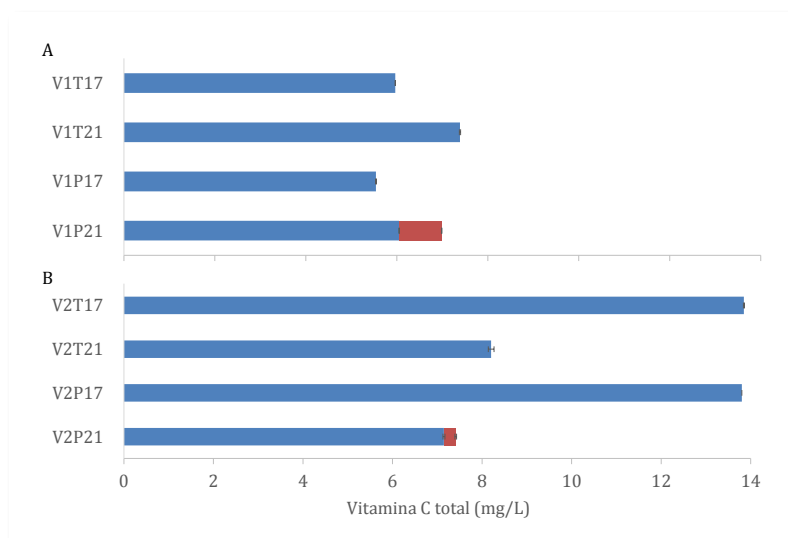


Figura 4.22. Concentración de Vitamina C total (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

3.4.3. Actividad antioxidante

El efecto de la temperatura sobre la actividad antioxidante se puede ver en la Figura 4.23. El aumento de temperatura provocó vinos con mayor actividad antioxidante, posiblemente debido a la mayor cantidad de compuestos fenólicos, en concreto, antocianos, compuestos derivados de flavan-3-ol, flavonoles, taninos y vitamina C que se obtuvo en los vinos elaborados a 21 °C.

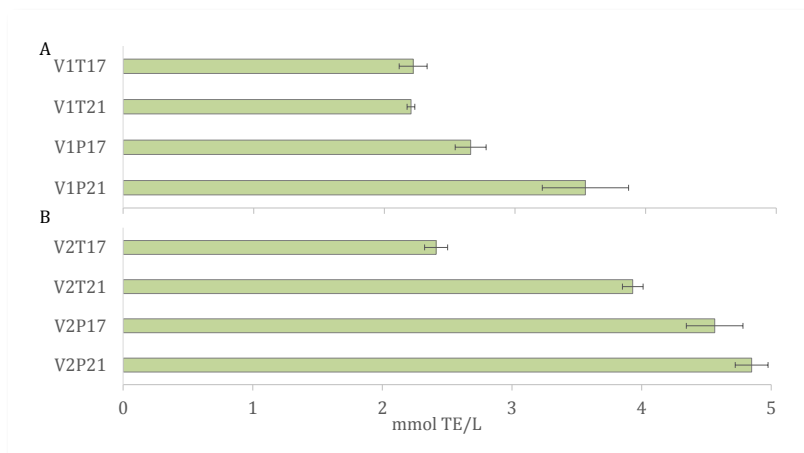


Figura 4.23. Actividad antioxidante (media y desviación estándar) en los vinos 1 (A) y vinos 2 (B).

3.4.4. Color

Absorbancias a 420 y 520 nm

Como ya se ha comentado anteriormente, el color es un atributo muy importante en las bebidas, ya que de él puede depender la aceptación del producto por parte del consumidor.

En la Figura 4.24, se muestran los valores de absorbancias a 520 y 420 nm de los vinos 1 y 2, considerados como la contribución a los tonos pardos y rojos en las bebidas, respectivamente. En ella se puede ver que, la temperatura hizo que se mostraran cambios en el color de las bebidas en este estudio, ya que los vinos obtenidos a 21°C fueron en general, más rojos y más pardos que los obtenidos a 17°C, presentando por tanto, estos últimos menor intensidad colorante que los de los 21°C.

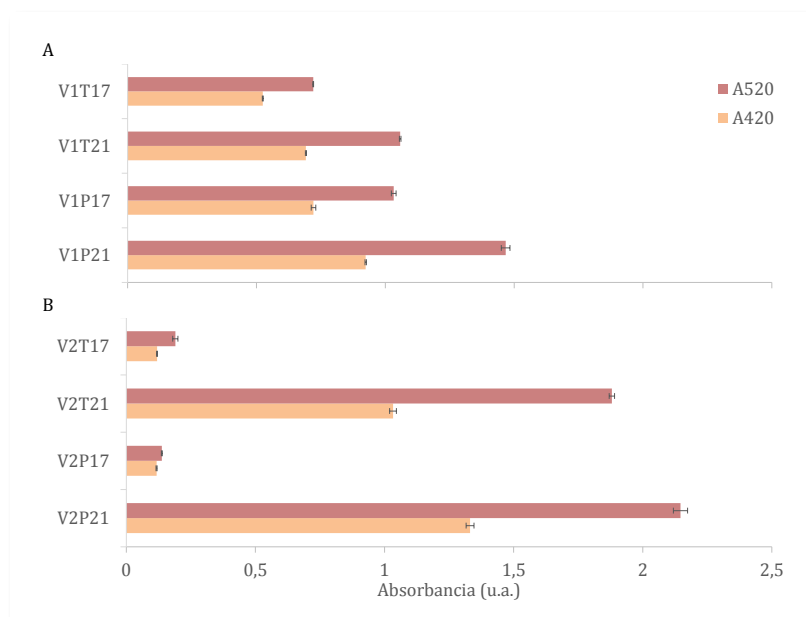


Figura 4.24. Valores de absorbancias a 420 y 520 nm (media y desviación estándar) de los vinos 1 y 2.

Color de pigmentos poliméricos

Los valores de color de pigmentos poliméricos se muestran en la Figura 4.25. Los vinos V1T21 y V2T21 presentaron mayor valor de contribución al color de los pigmentos poliméricos que los V1T17 y V2T17. Lo que puede deberse a que el proceso más largo de fermentación hiciese que se formaran más rápidamente los pigmentos poliméricos en los vinos obtenidos a 21°C o bien, que estos compuestos, precipitaran en los vinos elaborados a 17°C, debido a su alto peso molecular o bien evolucionaran a compuestos poliméricos no coloreados.

Lo contrario ocurre en V2P17, el cual, presentó mayor valor de contribución de los pigmentos poliméricos, que el vino obtenido a 21°C. Este hecho podría deberse a un mayor tiempo de elaboración de las bebidas. Sin embargo, los vinos 1 obtenidos a 21 y 17 °C, presentaron una contribución de los pigmentos poliméricos similar, no presentando diferencias significativas.

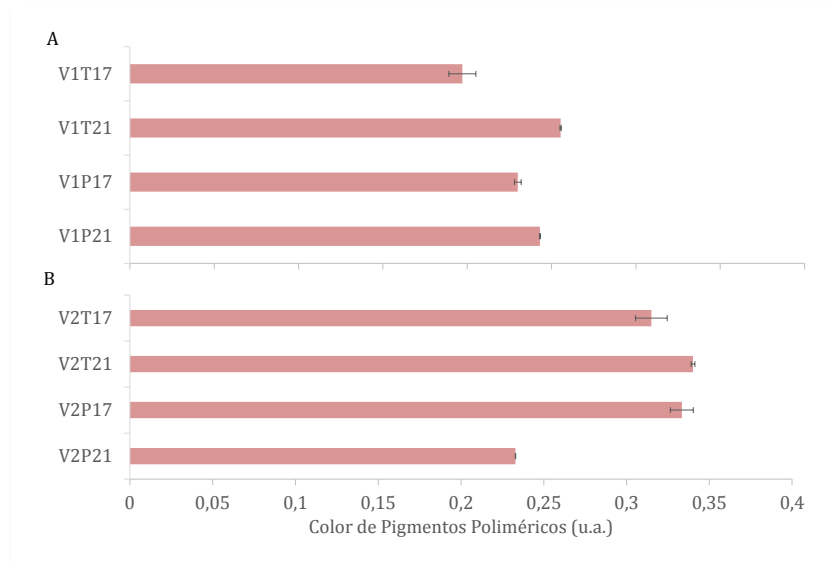


Figura 4.25. Color de pigmentos poliméricos (u.a.) (media y desviación estándar) de los vinos 1 y 2.

3.5. Análisis estadístico

Para comprobar si los vinos obtenidos se diferenciaban en cuanto a composición según la forma de elaboración (fermentación parcial o total, o bien según temperaturas utilizadas), se llevó a cabo un análisis estadístico de componentes principales, como se muestra en la Figura 4.26.

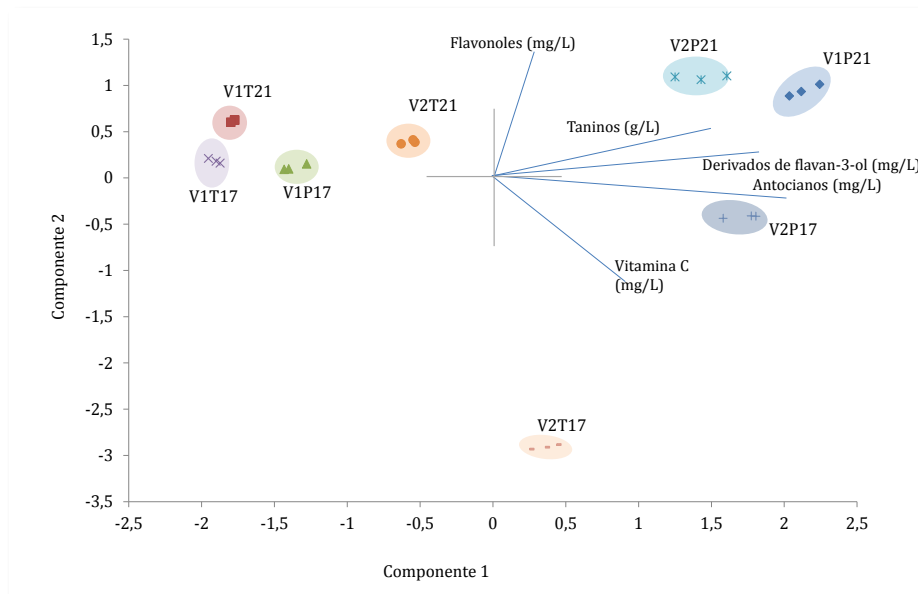


Figura 4.26. Componentes principales de los vinos en función de los compuestos bioactivos determinados en los vinos 1 y 2.

Como se puede observar, todos los vinos obtenidos mediante fermentación parcial, excepto uno (V1P17), quedaron en la parte de la derecha, lo que quiere decir que estos vinos están más influenciados por la componente 1 (composición de compuestos antocíánicos, derivados de flavan-3-ol, taninos y vitamina C). El resto de los vinos, todos los obtenidos por fermentación total y el vino V1P17, se separaron de los anteriores, quedando a la izquierda de la gráfica. Por tanto, para llevar a cabo el estudio estadístico de la relación con la actividad antioxidante, se decidió separar los vinos de fermentación parcial de los vinos de fermentación total.

3.5.1. Estudio estadístico de relación de la actividad antioxidante con los compuestos bioactivos de los vinos obtenidos mediante fermentación parcial

La relación de la actividad antioxidante con los compuestos bioactivos ha sido objeto de estudio por muchos autores como se ha comentado anteriormente, viendo que en muchos casos, la relación de los mismos con esta era considerable. Para comprobar si los compuestos bioactivos estudiados influían en los valores de la actividad antioxidante, se llevó a cabo un ajuste de regresión lineal simple entre la actividad antioxidante (variable dependiente) y cada uno de los totales de las distintas familias de compuestos por separado (variable independiente).

En la Figura 4.27 se muestra la relación de cada familia de compuestos con la actividad antioxidante mediante análisis estadístico de regresión simple:

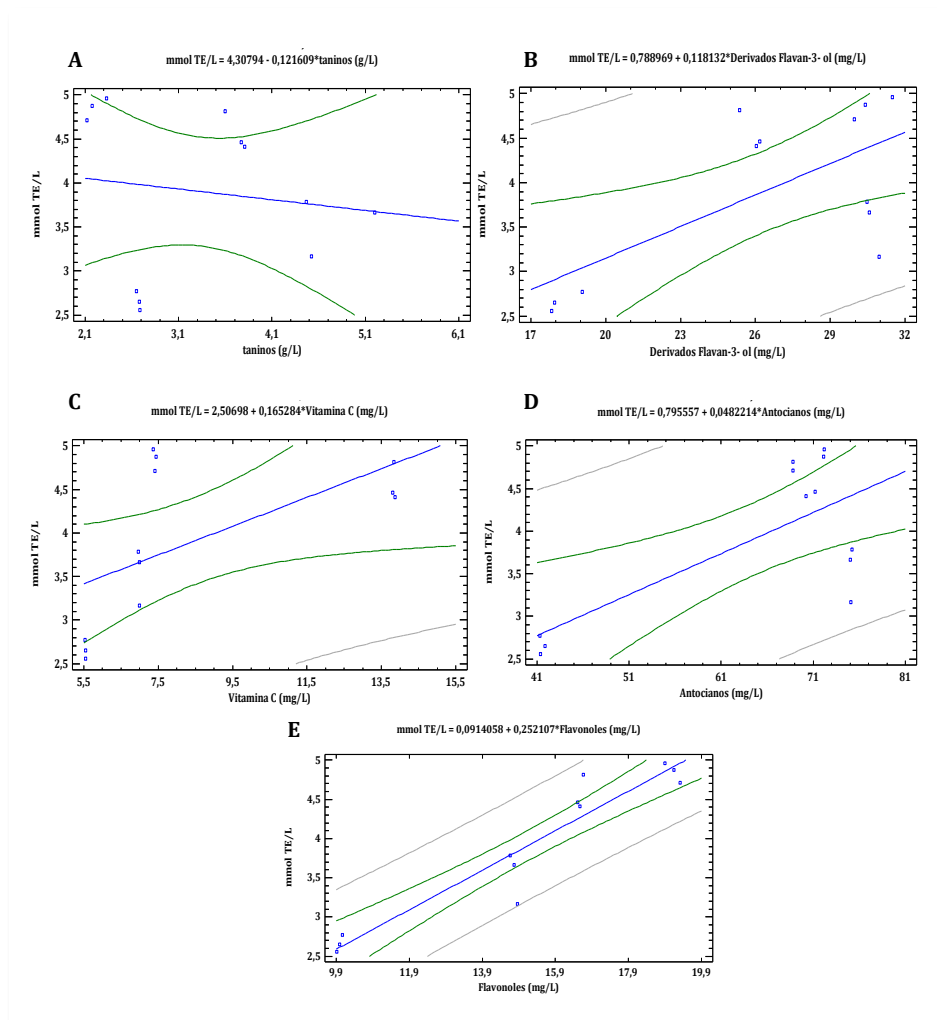


Figura 4.27. Relación de taninos totales (A), derivados de flavan-3-ol (B), Vitamina C (C), antocianos (D) y flavonoles (E) con la actividad antioxidante de los vinos de fermentación parcial de 21 y 17°C.

En todos los casos, excepto con los taninos, en los vinos de fermentación parcial se vio que existe una relación estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante (mmol TE/L) y las familias de compuestos bioactivos con un nivel de confianza del 95,0%.

Teniendo en cuenta que R mide la intensidad de la relación entre la variable independiente y una variable dependiente, la relación más fuerte se encontró con los flavonoles ($R=0.9503$). Los antocianos ($R=0.7293$), la vitamina C ($R=0.5953$) y los derivados de flavan-3-ol ($R=0.6772$) presentaron también una relación moderadamente fuerte con la actividad antioxidante. Estas familias son las que explicarían la mayor parte de variabilidad de los valores de la actividad antioxidante, ya que en el caso de los taninos, los valores de correlación fueron muy bajos ($R=-0.1362$).

En un estudio llevado a cabo por Zhang et al. (2016), se comprobó que el análisis de correlación reveló que los fenoles y taninos totales eran claramente responsables de la capacidad antioxidante (DPPH, FRAP and Reducing power), lo que no ocurre en este estudio en el caso de los taninos, pero sí se puede observar con otros compuestos fenólicos y la vitamina C.

Sanchez Moreno et al. (2003); Rupasinghe and Clegg (2007); Satora et al. (2008); Amidzic-Klaric et al. (2011); Lim et al. (2012); Johnson and Gonzalez de Mejia (2012), y muchos otros, afirman que la actividad antioxidante presenta una relación muy fuerte con el contenido total de compuestos fenólicos en productos ricos en estos compuestos, incluyendo los vinos de frutas. Ortiz et al. (2013), encontraron relaciones fuertes del contenido total de compuestos fenólicos en vinos de mora, arándano, manzana y manzana/mora como se puede observar en la Figura 4.28.

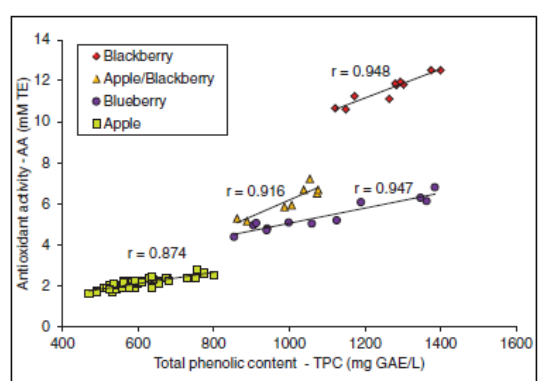


Figura 4.28. Relación de la actividad antioxidante con el total de compuestos fenólicos en vinos de distintas frutas (Ortiz et al., 2013).

Con el fin de comprobar si la actividad antioxidante, presenta una relación fuerte con el contenido total de contenido fenólicos, se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple de la actividad antioxidante frente a las distintas familias de compuestos analizados en este estudio.

El estadístico R^2 representa el porcentaje de variabilidad de Y que se ha explicado mediante el modelo ajustado de regresión, oscilando de 0% a 100%.

El gráfico Observado contra Predicho muestra los valores observados de Y en el eje vertical frente los valores predichos Y en el eje horizontal. Si el modelo ajusta bien, los puntos deberían estar aleatoriamente esparcidos alrededor de la línea diagonal, como se encuentran en este estudio.

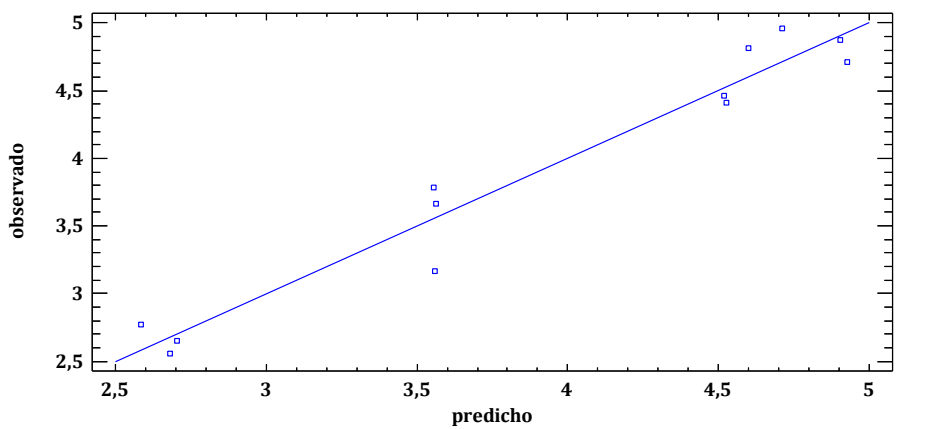


Figura 4.29. Análisis de regresión múltiple de la actividad antioxidante frente a los compuestos fenólicos.

La ecuación del modelo ajustado fue:

$$\text{Actividad antioxidante (mmol TE/L)} = 0,608397 - 0,111686 * \text{Derivados Flavan-3-ol (mg/L)} + 0,0248169 * \text{Antocianos (mg/L)} - 0,0141487 * \text{Taninos (g/L)} + 0,309981 * \text{Flavonoles (mg/L)}$$

Puesto que el valor-P en la Tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R^2 indica que el modelo así ajustado explica 95,2714% de la variabilidad de la actividad antioxidante.

En este estudio se ha determinado además la vitamina C, que no es un compuesto fenólico, pero es un compuesto bioactivo. En el estudio de regresión simple, se pudo ver que este compuesto presentó una relación moderadamente fuerte con la actividad antioxidante, por lo que se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple como el anterior pero incluyendo a esta vitamina viéndose que R^2 explicaba un 95,4794% de la variabilidad de los valores de la actividad antioxidante, siendo la ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Actividad Antioxidante (mmol TE/L)} = 0,364075 - 0,0118761 * \text{Derivados Flavan-3-ol (mg/L)} - 0,00162289 * \text{Antocianos (mg/L)} + 0,06226 * \text{Vitamina C (mg/L)} - 0,0768488 * \text{Taninos (g/L)} + 0,243861 * \text{Flavonoles (mg/L)}$$

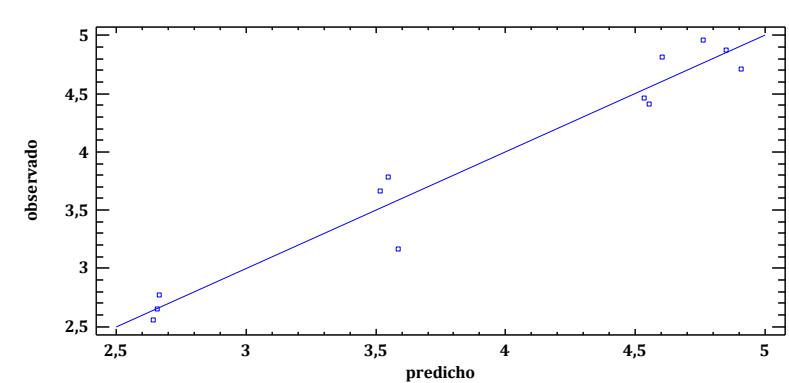


Figura 4.30. Análisis de regresión múltiple de la actividad antioxidante frente a los compuestos fenólicos y la vitamina C.

3.5.2. Estudio estadístico de relación de la actividad antioxidante con los compuestos bioactivos de los vinos obtenidos mediante fermentación total

En la Figura 4.31 se muestran las regresiones lineales de las distintas familias de compuestos frente a la actividad antioxidante:

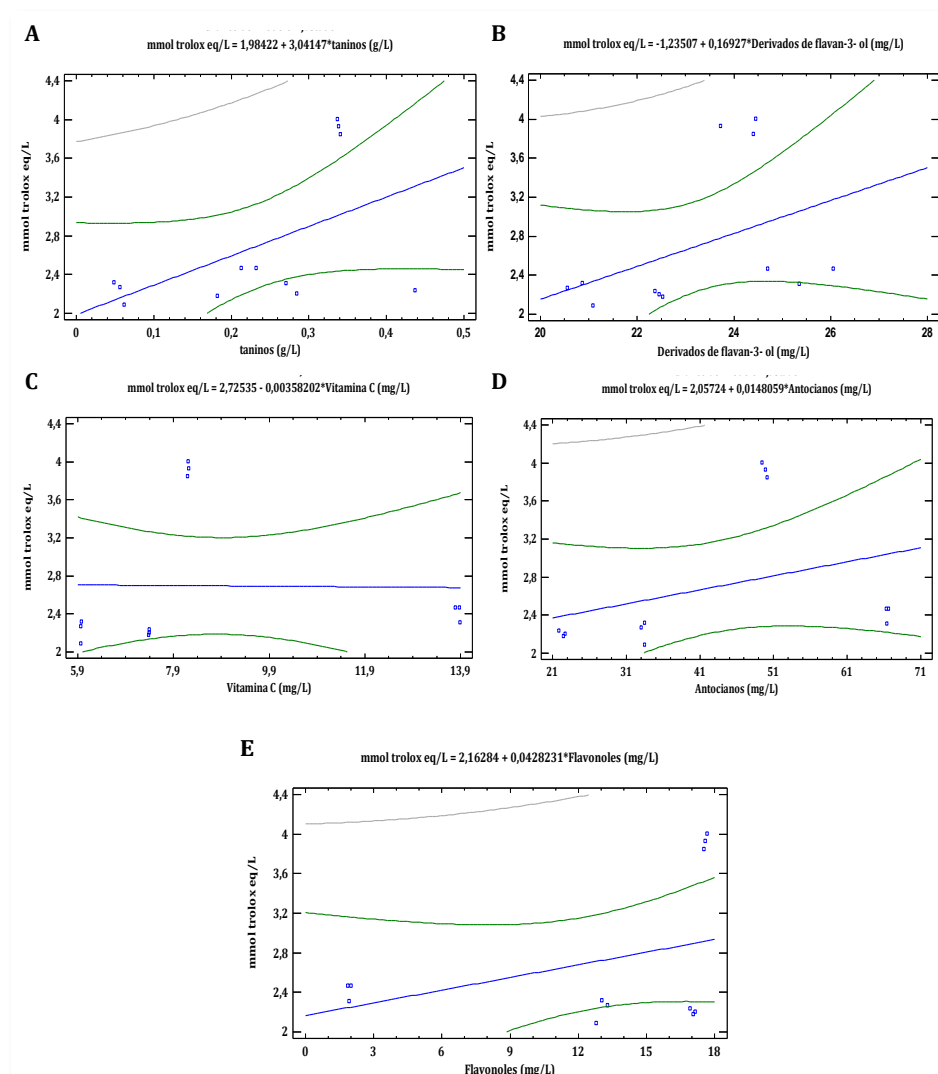


Figura 4.31. Relación de taninos totales (A), derivados de flavan-3-ol (B), Vitamina C (C), antocianos (D) y flavonoles (E) con la actividad antioxidante de los vinos de fermentación total de 21 y 17°C.

Llevando a cabo el mismo análisis que con vinos de fermentación parcial, se vio que la actividad antioxidante no presenta una relación estadísticamente significativa con ninguno de las familias individuales en estudio puesto que el valor-P en la Tabla ANOVA es mayor o igual a 0,05 con un nivel de confianza del 95,0% o más.

Sin embargo, según el análisis estadístico de regresión múltiple, el total de los compuestos fenólicos explicaría el 99.1262% de la variabilidad de la actividad antioxidante, siendo la ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Actividad antioxidante (mmol trolox eq/L)} = -1,35571 - 0,0255059 \cdot \text{Derivados flavan-3-ol (mg/L)} + 0,0610604 \cdot \text{Antocianos (mg/L)} + 0,158283 \cdot \text{Flavonoles (mg/L)} + 0,235031 \cdot \text{Taninos (g/L)}$$

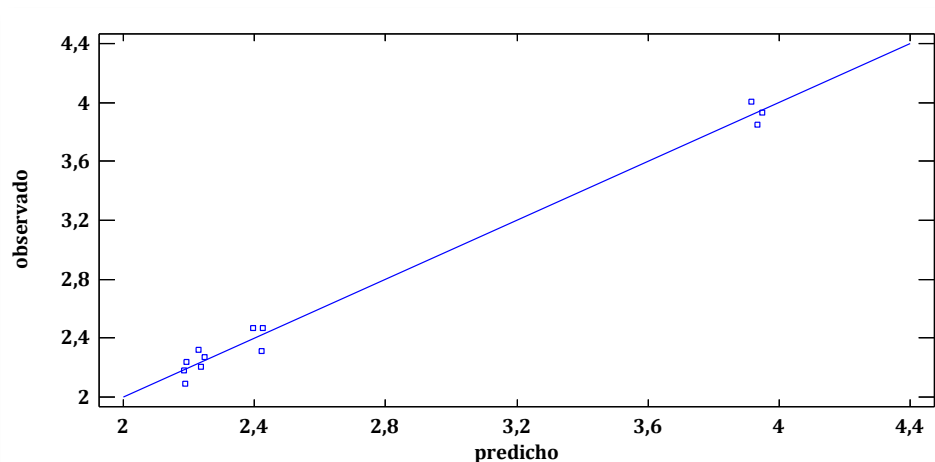


Figura 4.32. Análisis de regresión múltiple de la actividad antioxidante frente a los compuestos fenólicos.

Si se tiene en cuenta además la vitamina C:

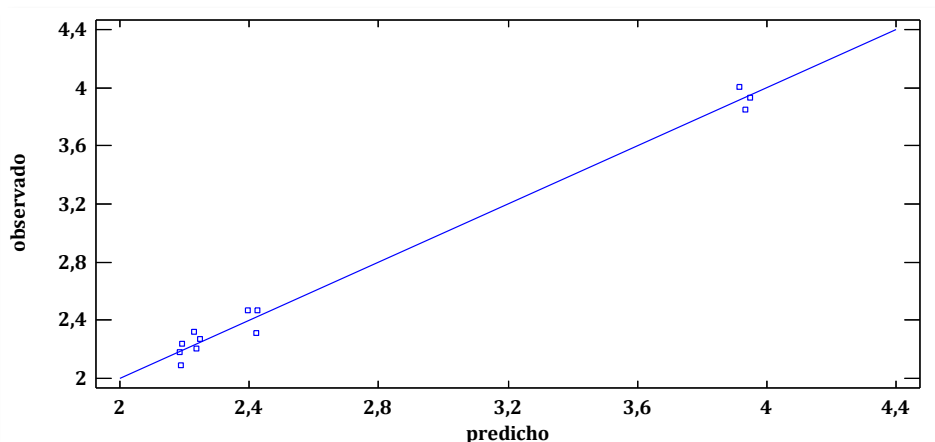


Figura 4.33. Análisis de regresión múltiple de la actividad antioxidante frente a los compuestos fenólicos y la vitamina C.

$$\text{Actividad antioxidante (mmol trolox eq/L)} = -1,3417 - 0,0271519 \cdot \text{Derivados flavan-3-ol (mg/L)} + 0,0610955 \cdot \text{Antocianos (mg/L)} + 0,0018624 \cdot \text{Vitamina C (mg/L)} + 0,228849 \cdot \text{taninos (g/L)} + 0,1589 \cdot \text{Flavonoles (mg/L)}$$

Puesto que el valor-P en la Tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0% y se podría explicar el 99.1263% de la variabilidad de los valores de la actividad antioxidante.

A modo de conclusión, se podría decir que los valores de la actividad antioxidante de los vinos obtenidos mediante fermentación parcial se ven más influenciados por la composición de los compuestos monómeros, ya que se ha podido comprobar que existía relación con la actividad antioxidante de forma individual (excepto en el caso de los taninos totales, que son compuestos más polimerizados), y de forma conjunta.

En el caso de los vinos de fermentación total no se ha encontrado relación alguna de forma individual. En estos últimos, como se ha ido explicando durante este capítulo, los compuestos monómeros se podrían haber combinado por otros compuestos dando lugar a compuestos de mayor peso molecular.

3.6. Efecto de los tratamientos postfermentativos en los vinos elaborados

El metabisulfito potásico ($K_2S_2O_5$) (E-224) es una sal de origen inorgánico que se disocia en medio ácido para generar dióxido de azufre. El rendimiento teórico de SO_2 que proporciona el $K_2S_2O_5$ es del 57%. El uso correcto de este aditivo hace que se obtengan vinos menos oxidados, con mejor color y aroma, y menor acidez volátil. Este compuesto se usa en los vinos por polivalencia ya que es antioxidante (posee propiedades reductoras), antioxidásico (destruye las oxidasas), antimicrobiano ya que presenta actividad inhibidora sobre levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas, etc.

Los principales ácidos en los arándanos son el cítrico y el málico (Dharmadhikari, 1996). Para la neutralización de los mismos, los principales compuestos que se utilizan son el bicarbonato potásico y el carbonato cálcico (Jackson, 2008). En este trabajo, se ha utilizado como desacidificante el bicarbonato potásico ($KHCO_3$) (E-501) que actúa modificando el pH, disminuyendo la acidez (Santos et al., 2016). Este aditivo alimentario, es capaz de reaccionar con los ácidos presentes en los alimentos y bebidas y neutralizarlos.

3.6.1. pH y color

El pH como se ha comentado anteriormente, es un parámetro determinante para la elaboración de bebidas. Además, el pH final de los vinos debe estar comprendido dentro de unos valores apropiados ya que podría afectar a la aceptación del producto por el consumidor si no es el idóneo.

Para mejorar las características organolépticas de los vinos tras la fermentación, se corrigió el pH y se añadió metabisulfito potásico a modo de conservante en botella (Tabla 4.18). La corrección de acidez en las bebidas finales, hizo que en todos los casos, el pH aumentara aproximadamente en 0.4-0.6 unidades de media, siendo los valores de pH de los vinos finales similares a los valores que presenta un vino de uva (3.1-4.0), excepto en el caso del vino V2T17, cuyo valor fue menor, probablemente debido a que el pH tras el proceso de fermentación fue muy bajo. El rango de los pH obtenidos en los diferentes vinos está de acuerdo con los pH (2.8-3.7) de los vinos de arándanos comercializados (Johnson and Gonzalez de Mejia, 2012). Se encontraron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% entre los valores de pH de los vinos tras elaboración y tras la adición de bicarbonato potásico, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de pH cuando se añadió el metabisulfito potásico, excepto en el vino V1T21, aunque la diferencia de valores de pH no fue muy grande.

Tabla 4.18. Valores de pH (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los vinos de arándano, tras la fermentación y tras la adición de bicarbonato potásico y metabisulfito potásico.

	Tras elaboración	1 g/L KHCO_3	175 mg/L $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$
V1P21	2.76±0.036 ^a	3.18±0.010 ^b	3.21±0.010 ^b
V1T21	2.60±0.006 ^a	3.15±0.006 ^b	3.13±0.000 ^c
V1P17	2.86±0.000 ^a	3.44±0.000 ^b	3.44±0.010 ^b
V1T17	2.74±0.010 ^a	3.30±0.026 ^b	3.32±0.015 ^b
V2P21	2.64±0.000 ^a	3.15±0.010 ^b	3.16±0.015 ^b
V2T21	2.90±0.006 ^a	3.31±0.000 ^b	3.32±0.010 ^b
V2P17	2.60±0.006 ^a	3.03±0.010 ^b	3.03±0.010 ^b
V2T17	2.43±0.010 ^a	2.82±0.000 ^b	2.82±0.000 ^b

El color del producto final depende de muchos factores (Gómez-Plaza et al., 2000). Como se ha explicado en capítulos anteriores, los antocianos son compuestos que según en el pH que se encuentren en la bebida o alimento, varían su color. De este modo, el color de los productos puede verse sometido a cambios si se modifica el valor el mismo durante el procesado. En este caso, el bicarbonato potásico es un corrector de la acidez y su función es aumentar el pH de los medios, con lo que su adición hace que cambie el color del producto final. Por otro lado, se sabe que la adición de metabisulfito potásico, como agente antibacteriano, antilevaduriano, antioxidante, etc (Garaguso et al., 2015), hace que se modifique el color de los vinos, ya que es capaz de reaccionar con los compuestos presentes en el medio, como por ejemplo, con los antocianos monómeros, haciendo que haya un desplazamiento crómico y estos dejen de ser rojos pasando a incoloros (Morata et al., 2006), o bien puede hacer que se den reacciones de polimerización de estos compuestos, dando lugar a compuestos resistentes a la decoloración del SO_2 .

Por ello, el color de los vinos de arándanos de este trabajo, se vio afectado, tras la adición de los compuestos utilizados en los tratamientos postfermentativos.

La Figura 4.34 muestra los valores de las absorbancias a 520 y 420 nm de los vinos al terminar el proceso de fermentación y de los vinos tras el tratamiento de corrección, es decir, los corregidos con los aditivos anteriores.

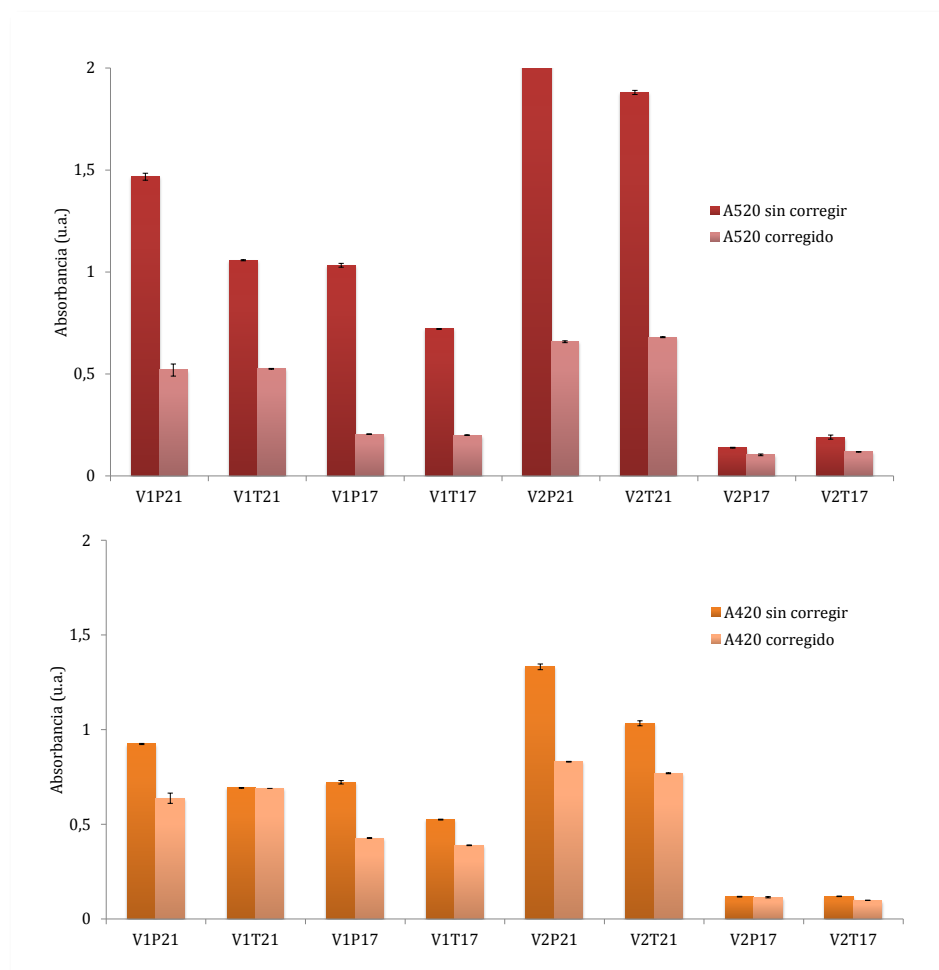


Figura 4.34. Absorbancia a 420 y 520 nm (media y desviación estándar) de los vinos 1 y 2, con y sin tratamientos postfermentativos.

Por un lado, se puede comprobar que los vinos antes de corregir, eran más pardos y más rojos que los vinos corregidos, ya que las absorbancias a 520 y 420 nm obtenidas para ellos eran mayores que las obtenidas para los vinos corregidos. Además, los vinos pasaron de ser más rojos que pardos (vinos sin tratamiento post fermentativo) a ser más pardos que rojos (vinos con tratamiento) (Figura 4.34). Como consecuencia de esto, la adición del metabisulfito potásico y el bicarbonato potásico, afectaría al color e hizo que disminuyeran las absorbancias a 520 y 420nm de los vinos en estudio, y por tanto disminuyera la intensidad colorante e incrementara la tonalidad de los vinos (Tabla 4.19).

Tabla 4.19. Valores de absorbancias a 520 nm y 420 nm (u.a.), intensidad colorante (expresada como la suma de las dos absorbancias) y tonalidad de los vinos 1 y 2, con y sin tratamientos postfermentativos.

	A ₄₂₀	A ₅₂₀	Intensidad colorante	Tonalidad
V1P21	0.924±0.003	1.47±0.017	2.39	0.630
V1P21 C	0.638±0.027	0.519±0.030	1.16	1.23
V1T21	0.692±0.002	1.06±0.003	1.75	0.654
V1T21 C	0.608±0.000	0.525±0.002	1.13	1.16
V1P17	0.721±0.009	1.03±0.009	1.75	0.699
V1P17 C	0.427±0.002	0.205±0.001	0.632	2.09
V1T17	0.525±0.002	0.720±0.002	1.25	0.728
V1T17 C	0.389±0.002	0.200±0.002	0.589	1.95
V2P21	1.33±0.015	2.15±0.030	3.48	0.620
V2P21 C	0.830±0.002	0.658±0.005	1.49	1.26
V2T21	1.03±0.013	1.88±0.010	2.91	0.549
V1T21 C	0.769±0.003	0.680±0.002	1.45	1.13
V2P17	0.117±0.002	0.138±0.002	0.255	0.852
V2P17C	0.114±0.003	0.103±0.004	0.218	1.11
V2T17	0.119±0.002	0.190±0.010	0.309	0.626
V2T17 C	0.098±0.001	0.118±0.002	0.216	0.836

Vinos C: vinos Corregidos (tras realizar el tratamiento postfermentativo)

Los tratamientos de corrección produjeron una disminución de todas las absorbancias, siendo la disminución mucho mayor a 520 nm por lo que la intensidad colorante disminuyó, mientras que la tonalidad aumentó superando el valor de 1.

La adición de SO₂ es uno de los factores que más afecta al color de los vinos jóvenes. Este compuesto, puede “blanquear” a las antocianinas libres en el vino por ataque nucleófilo en la posición 4 del anillo central del catión flavilio en los vinos tintos (efecto que es reversible). A pH 3.2, aproximadamente, el 96% del ácido sulfúrico se encuentra en forma de aniones de bisulfito (HSO₃⁻), que reaccionan con el catión, haciendo que desaparezca el color proporcionado por los antocianos (He et al., 2012).

En la Figura 4.34 se puede ver que la disminución de la absorbancia a 520 nm tras la adición del metabisulfito potásico fue menor en los vinos 2 de fermentación parcial y total corregidos de 17 grados (24.9 y 38.1%, respectivamente). Esto puede ser debido a que los pH de estos vinos fueron más bajos que los de los demás vinos (3.03 y 2.82, respectivamente). La disminución del valor de la absorbancia de los vinos restantes fue de entre un 50.4 y un 80.2% y sus pH estuvieron comprendidos entre 3.13 y 3.44.

Sin embargo, la absorbancia a 420 nm, tomada como contribución de los tonos pardos, se vio menos afectada que la absorbancia a 520 nm, ya que, aunque los valores disminuyeron, lo hicieron en menor porcentaje que esta última. Se encontraron diferencias significativas entre todos los valores de absorbancias de los vinos obtenidos antes y después del tratamiento de corrección.

Como conclusión, se puede decir que el cambio de pH del medio por adición del bicarbonato potásico, y sobre todo, a que el metabisulfito potásico, interaccionara con los antocianos, haciendo que perdieran su color, volviéndose incoloros (efecto del blanqueamiento en vinos del SO_2), hizo que el color de los vinos se viese modificado. Además, esto podría evidenciar que los tratamientos postfermentativos a los que se sometieron los vinos, afectarían más al color rojo que a los tonos pardos del producto final.

Para la determinación de la contribución al color de los pigmentos poliméricos, se utilizó un método donde el metabisulfito potásico, actúa como decolorante de los antocianos monómeros hasta que queda el color residual de los pigmentos poliméricos resistentes a este compuesto. El color residual es debido a los pigmentos poliméricos coloreados que son compuestos resistentes al efecto blanqueante del SO_2 en vinos (Versari et al., 2008).

Como se ha comentado anteriormente, los antocianos pueden reaccionar con otros compuestos para formar polímeros, que sigan teniendo color rojo-naranja. Los tratamientos postfermentativos (tiempo de almacenamiento, temperatura y la adición de dióxido de azufre), además, hacen que disminuya el contenido de antocianos monoméricos e incremente el contenido de pigmentos poliméricos (Soto Vázquez et al., 2010). En la Figura 4.35, se muestran los valores de color de pigmentos poliméricos obtenidos para cada vino.

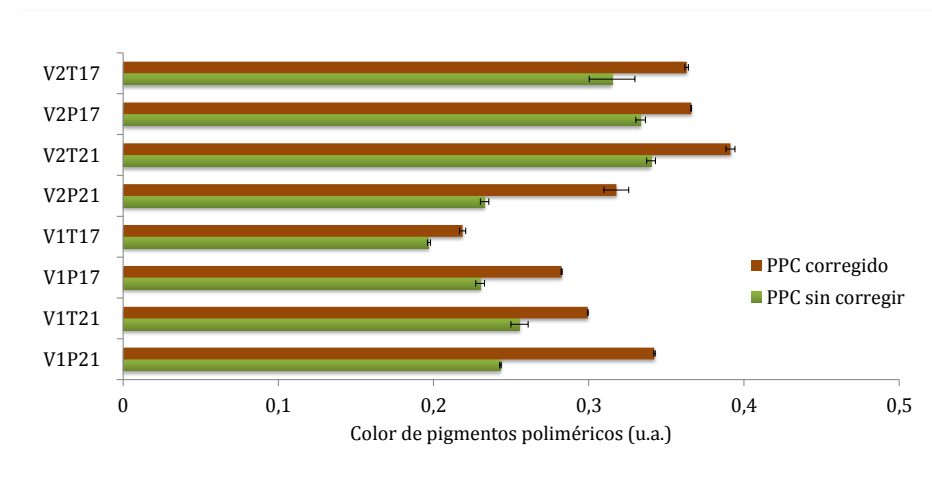


Figura 4.35. Color de pigmentos poliméricos (media y desviación estándar) de los vinos 1 y 2, con y sin tratamientos postfermentativos.

En todos los casos se pudo comprobar que la adición del metabisulfito potásico, hizo que la contribución al color de los pigmentos poliméricos fuese mayor, encontrándose diferencias significativas entre los valores de color de pigmentos

poliméricos entre cada vino tratado y sin tratar. Con este hecho, se podría confirmar que la adición de este compuesto hace que disminuya el color rojo de los antocianos monómeros y aumente el color de los pigmentos poliméricos debido a la formación de otros compuestos más polimerizados.

3.6.2. Compuestos bioactivos

Antocianinas

La pérdida de color rojo (absorbancia 520 nm) que se ha visto en el apartado anterior, se podría corroborar con el decrecimiento del contenido de antocianinas tras los tratamientos postfermentativos, como se muestra en la Figura 4.36.

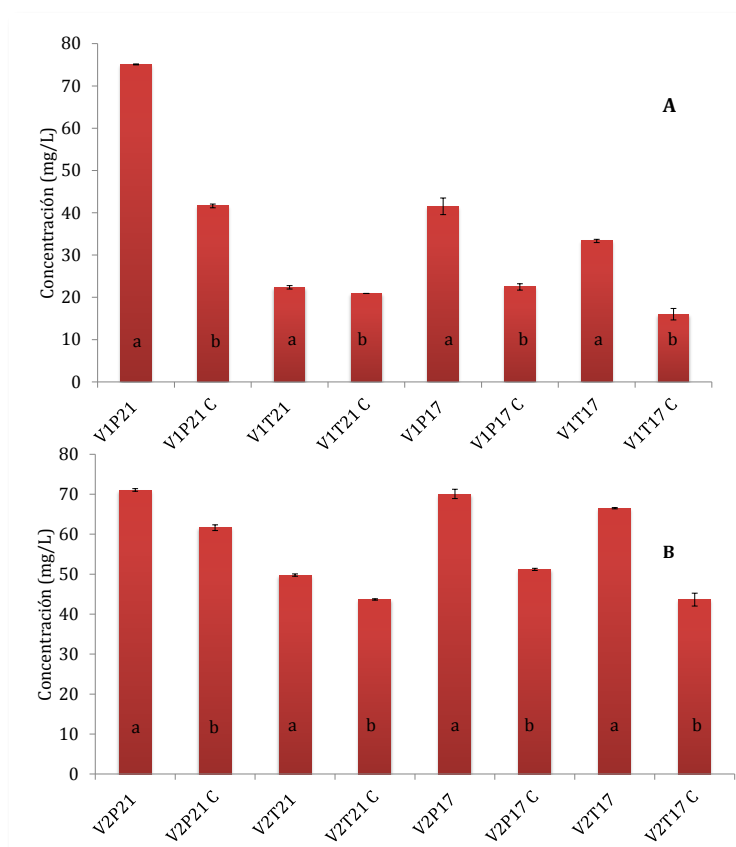


Figura 4.36. Concentración de antocianinas (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los vinos 1 (A) y Vinos 2 (B), con y sin tratamientos postfermentativos.

Los vinos sin corregir (sin tratamientos postfermentativos), presentaron siempre, mayor concentración de antocianos totales que los vinos tratados, encontrándose diferencias significativas en el total de los antocianos entre todos los vinos tratados y sin tratar, obtenidos en las mismas condiciones. Santos et al. (2016) no encontraron diferencias significativas en el contenido total de antocianinas monoméricas cuando añadieron carbonato cálcico (desacidificante) a los vinos de arándanos en las dosis 0.9 y 1.8 mg/L. Con lo que se podría pensar, que la

disminución del contenido de antocianinas monoméricas, podría ser debida principalmente al efecto blanqueante del SO₂.

En los vinos de 21°C tanto vinos 1 como vinos 2 (Figura 4.36A), se vio un patrón de disminución de antocianos. La concentración de antocianos totales fue mayor en los vinos de fermentación parcial sin corregir, seguidos por sus corregidos. Tras este, les siguieron los vinos de fermentación total sin corregir, quedando en último lugar los corregidos de estos últimos. Por tanto, en estos vinos, los vinos de fermentación parcial contuvieron más antocianos que los vinos de fermentación total sin corregir.

De igual forma, se encontró un patrón de comportamiento en los vinos de 17°C (1 y 2) (Figura 4.36B). Los vinos sin corregir presentaron mayor concentración de antocianos totales que los vinos corregidos. La diferencia con el patrón de los vinos de 21°C, fue que la concentración de antocianinas de los vinos de fermentación parcial corregidos de ambas proporciones fue menor que en los vinos de fermentación total sin corregir.

De este modo, se puede confirmar de nuevo que los vinos de menor tiempo de fermentación y sin tratar, fueron los que presentaron mayor concentración de antocianos totales y como se ha visto anteriormente, presentaron mayor contribución de tonos rojos en las bebidas obtenidas.

Derivados de flavan-3-ol

En el caso de estos derivados, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones totales de los vinos tratados y sin tratar, excepto en el V1P21. Este hecho indicaría que la concentración de los derivados de flavan-3-ol se vería afectada por los tratamientos postfermentativos, como se puede observar en la Figura 4.37.

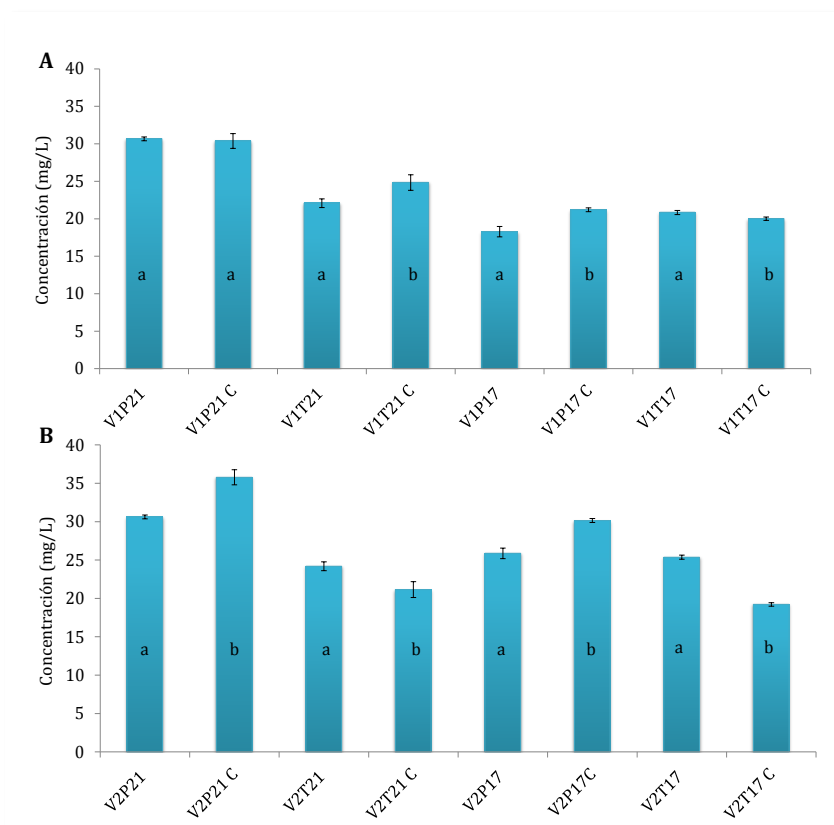


Figura 4.37. Concentración de compuestos derivados de flavan-3-ol (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los vinos 1 (A) y 2 (B), con y sin tratamientos postfermentativos.

Flavonoles

En el caso de los flavonoles totales de los vinos obtenidos se encontraron diferencias significativas entre los vinos que se corrigieron y los que no se trataron como se muestra en la Figura 4.38.

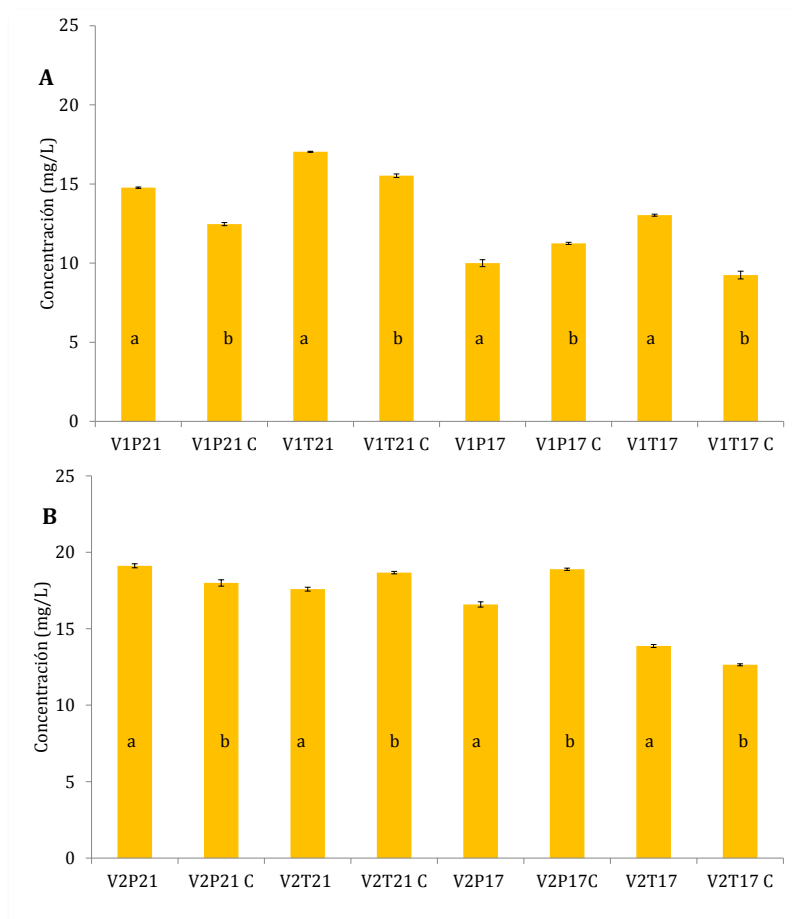


Figura 4.38. Concentración de flavonoles totales (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los vinos 1 (A) y 2 (B), con y sin tratamientos postfermentativos.

Por tanto, los flavonoles fueron compuestos que se vieron afectados por la adición del corrector de acidez y por el metabisulfito potásico. Santos et al. (2016) encontraron poca diferencia entre los vinos tratados con sucrosa y carbonato cálcico a diferentes concentraciones de este último, por tanto, al igual que los antocianos, los flavonoles podrían verse más afectados por la adición de metabisulfito potásico. Se podría justificar este hecho por el fenómeno de polimerización que ocurre al adicionar este aditivo, ya que los flavonoles pueden aumentar también el color de los vinos tintos por ser buenos copigmentos de los antocianos (Boulton, 2001).

Vitamina C

El contenido de vitamina C, tras la adición del corrector de acidez y el metabisulfito potásico no se vio muy afectado, como se puede ver en la Figura 4.39.

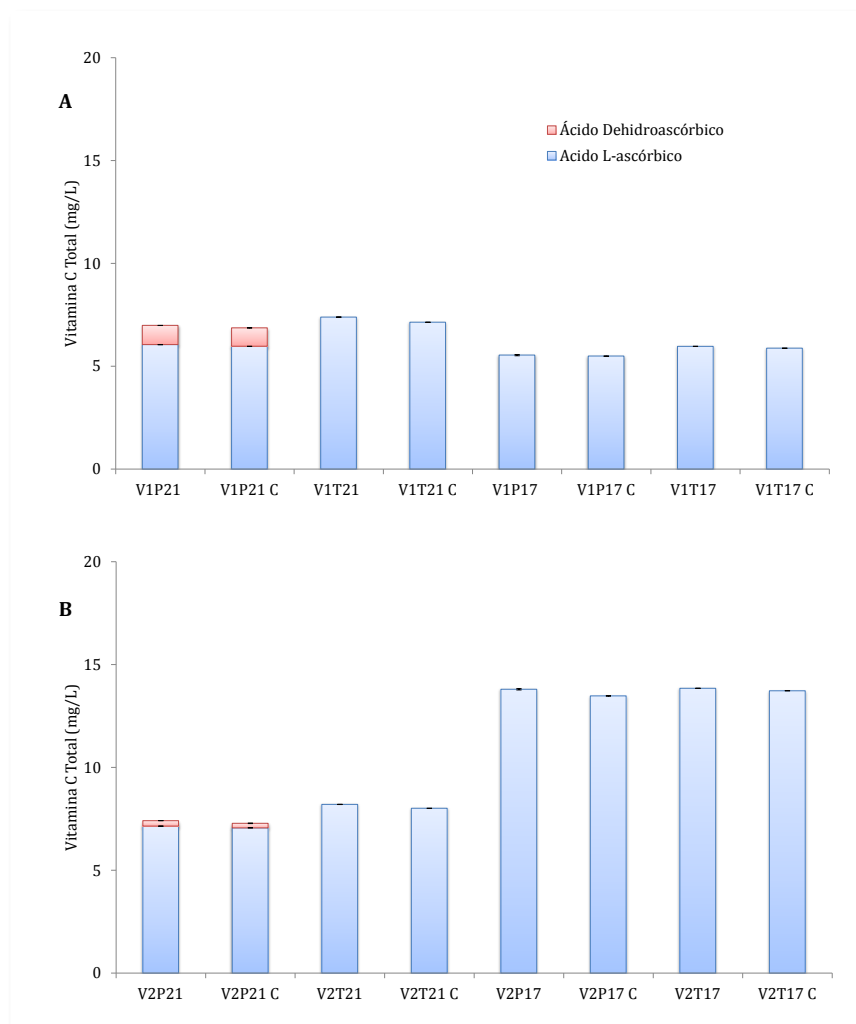


Figura 4.39. Concentración de Vitamina C (media y desviación estándar) de los vinos 1 (A) y vinos 2 (B), con y sin tratamientos postfermentativos.

De igual forma que en los compuestos bioactivos anteriores, se realizó un análisis estadístico ANOVA de un factor para conocer si existían diferencias significativas entre los vinos que fueron tratados y los que no. El análisis concluyó que, en todos los casos, no existen diferencias significativas con un nivel del 95,0% de confianza, entre las concentraciones de vitamina C obtenidas para los diferentes vinos. De modo que, la adición del corrector de acidez y del metabisulfito potásico, no afectó a la concentración de vitamina C total. Este hecho, podría demostrar que la vitamina C fue resistente a la adición de metabisulfito y bicarbonato potásico.

Taninos totales

Los taninos son compuestos que tampoco se vieron afectados en la mayoría de los vinos tras los tratamientos postfermentativos. Se realizó el mismo análisis que en los casos anteriores y se vio que no existían diferencias significativas con un nivel del 95,0% de confianza, excepto en el vino V1T21, que sí las presentó. Las concentraciones de taninos totales se muestran en la Figura 4.40.

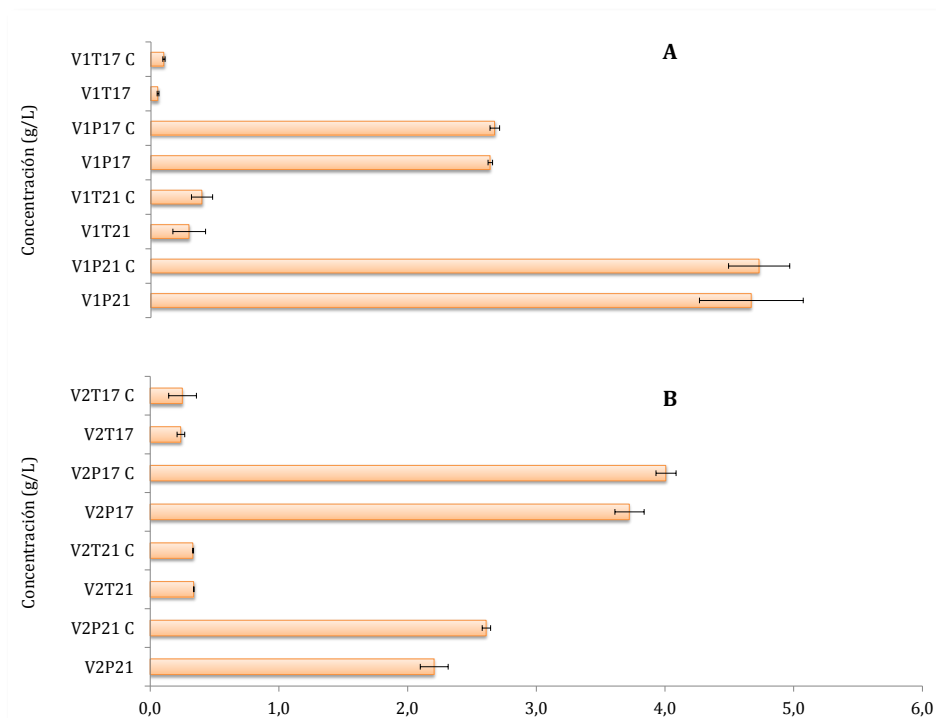


Figura 4.40. Concentración de taninos totales (media y desviación estándar) de los vinos 1 (A) y vinos 2 (B), con y sin tratamientos postfermentativos.

3.6.3. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante, como ya se ha comentado antes, está relacionada con la concentración de compuestos fenólicos, no afectando la adición de SO_2 (aditivo con acción antioxidante) a la misma ya que este aditivo no reacciona con el radical DPPH· (Manzoncoco et al., 1998; Del Caro et al., 2010). De esta forma, a continuación, se comprobará si el bicarbonato potásico afectó a la actividad antioxidante.

Los valores de actividad antioxidante obtenidos para los vinos corregidos y sin corregir se muestran en la Figura 4.41.

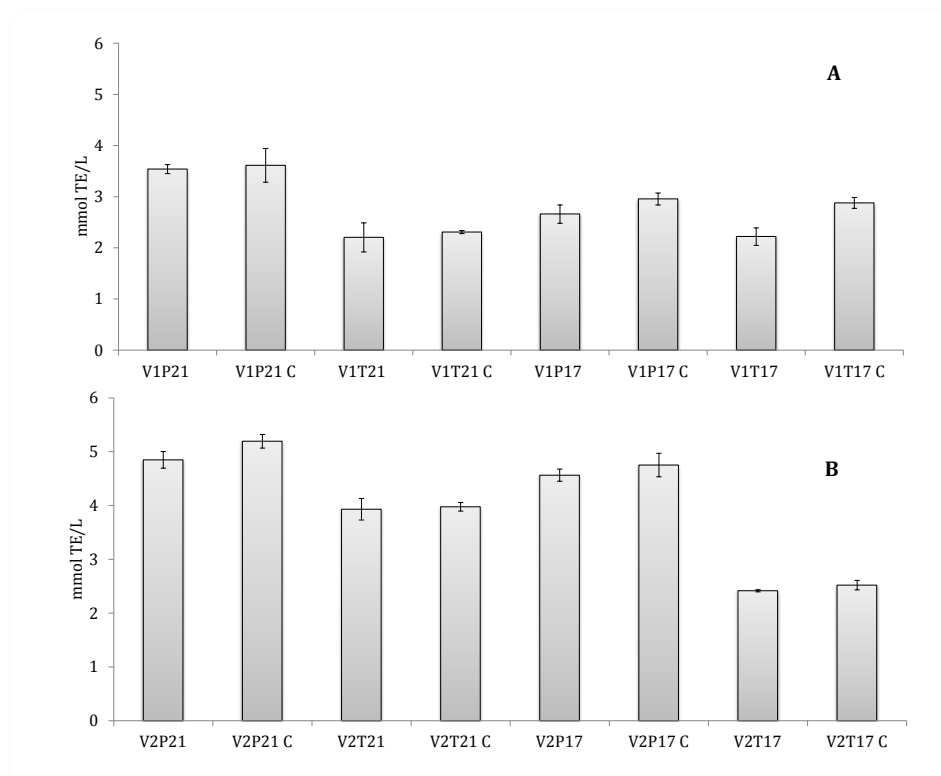


Figura 4.41. Valores de actividad antioxidante (media y desviación estándar) de los vinos 1 (A) y vinos 2 (B), con y sin tratamientos postfermentativos.

Se pudo comprobar que no existieron diferencias significativas con un nivel del 95,0% de confianza, entre los valores de actividad antioxidante de los vinos sin corregir y corregidos. Este hecho puede deberse a un equilibrio o balance entre compuestos que se degradan, oxidan, etc y los que se forman tras los tratamientos postfermentativos.

La relación de los compuestos bioactivos en estudio y la actividad antioxidante de los vinos corregidos y sin corregir se muestra en la Tabla 4.20.

Tabla 4.20. Valores de relación (R^2) de los compuestos bioactivos con la actividad antioxidante de los vinos de fermentación parcial y total, con y sin tratamientos postfermentativos.

	Antocianos	Flavanoles	Flavonoles	Taninos	Vitamina C
Vinos de fermentación parcial	53.2	45.9	90.3	no	35.4
Vinos de fermentación parcial corregido	91.5	70.1	87.9	no	no
Vinos de fermentación total	no	no	no	no	no
Vinos de fermentación total corregido	no	no	no	no	no

Los valores que se muestran en la Tabla son % de R^2 .

no: no se ha encontrado una relación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%.

Según la Tabla 4.20, los vinos de fermentación parcial, fueron los que mostraron algunos cambios respecto a los mismos corregidos, ya que cuando se corrigieron estos, la vitamina C no presentó relación estadísticamente significativa con la actividad antioxidante. Los taninos se comportaron de igual forma, y en el caso de los compuestos fenólicos monómeros se pudo ver un incremento en la relación en cuanto a los antocianos y a los derivados de flavan-3-ol.

Nuevamente, con el fin de obtener de comprobar si la actividad antioxidante presenta alguna relación con el contenido total de contenido fenólicos cuando los vinos fueron corregidos, se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple de la actividad antioxidante frente a las distintas familias de compuestos analizados en este estudio, al igual que anteriormente se ha hecho con los vinos sin tratar.

En el caso de los vinos de fermentación parcial corregidos, según el análisis estadístico de regresión múltiple el R^2 explicaría el 98.489% de la variabilidad de la actividad antioxidante. El ajuste se puede encontrar en la Figura 4.42.

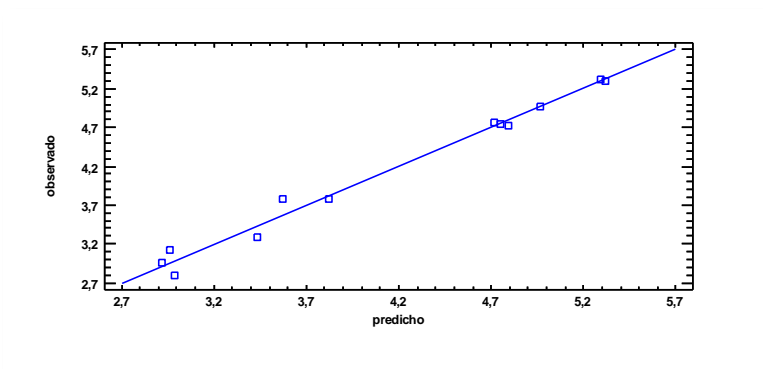


Figura 4.42. Regresión múltiple de todos los compuestos bioactivos de los vinos de fermentación parcial para su estudio de relación con la actividad antioxidante.

$$\text{Actividad antioxidante (mmol TE/L)} = 2,51781 - 0,0449233 * \text{Vitamina C (mg/L)} + 0,0820109 * \text{Total antocianos (mg/L)} - 0,106588 * \text{Total derivados de flavan-3-ol (mg/L)} + 0,0981174 * \text{Total flavonoles (mg/L)}$$

En el caso de los vinos de fermentación total, también se encontró una relación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%. De igual forma que en el apartado anterior, se pudo comprobar que los vinos de fermentación total no se relacionan con los compuestos de forma individual, sino que la relación se encuentra cuando se tienen en cuenta todos los compuestos. El estadístico R^2 explicaría el 96.9% de la variabilidad de la actividad antioxidante en los vinos de fermentación total corregidos.

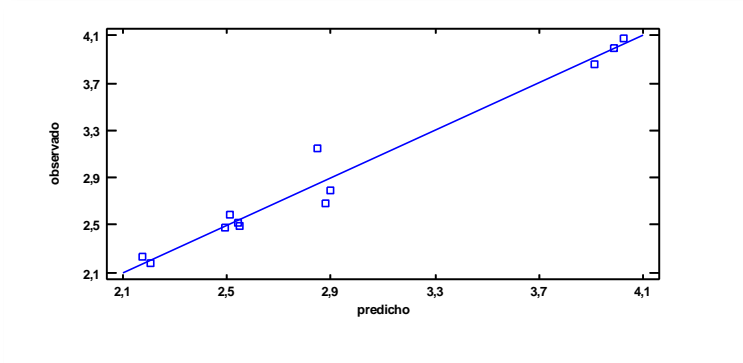


Figura 4.43. Regresión múltiple de todos los compuestos bioactivos de los vinos de fermentación total para estudio de su relación con la actividad antioxidante.

Siendo la ecuación ajustada la siguiente:

$$\text{Actividad antioxidante (mmol TE/L)} = 6,58207 - 0,540073 * \text{Taninos (g/L)} + 0,0155197 * \text{Total antocianos (mg/L)} - 0,247566 * \text{Total derivados de flavan-3-ol (mg/L)} + 0,113913 * \text{Total Flavonoles (mg/L)}$$

Si comparamos las relaciones anteriores con las que se obtuvieron en el apartado anterior de los vinos sin tratar (vinos sin tratar de fermentación total R^2 explicaba el 99.1263% de la variabilidad de la actividad antioxidante y para los de fermentación parcial el 95.4794%), se puede comprobar que los vinos de fermentación parcial presentaron mayor R^2 cuando fueron corregidos y los vinos de fermentación total mostraron un R^2 menor al corregirse.

3.7. Análisis sensorial

3.7.1. Evaluación del color, sabor y aroma

Para la evaluación de la aceptación por los consumidores de los diferentes vinos elaborados a partir de arándanos de la variedad Windsor, se realizó un análisis sensorial de acuerdo a las normas ISO para evaluar sus características organolépticas.

En primer lugar, se evaluó el aroma, el sabor y el color de todos los vinos obtenidos. Para ello, se entregó a cada catador una hoja de cata con la que podrían evaluar los vinos mediante una prueba de escalas con tres grados y seis puntuaciones: indeseable (1-2), aceptable (3-4) y deseable (5-6), cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.21. En ella se recoge el número de jueces que asignaron, a cada parámetro evaluado, cada una de las puntuaciones de la escala establecida.

Tabla 4.21. Puntuaciones del análisis sensorial de los vinos de arándanos elaborados a diferentes temperaturas, proporciones (fruto/disolución azucarada) y tiempo de fermentación.

		Indeseable		Aceptable		Deseable	
		1	2	3	4	5	6
V1P21	Sabor	0	0	0	4	2	4
	Color	0	0	1	1	4	4
	Aroma	0	0	4	4	1	1
V1T21	Sabor	2	5	2	0	1	0
	Color	2	0	3	3	2	0
	Aroma	0	3	4	1	1	1
V1P17	Sabor	1	1	2	3	2	1
	Color	0	0	1	1	1	7
	Aroma	0	0	7	3	0	0
V1T17	Sabor	3	4	1	1	1	0
	Color	1	1	5	1	2	0
	Aroma	0	1	2	4	2	1
V2P21	Sabor	0	0	1	5	2	2
	Color	0	0	2	5	3	0
	Aroma	2	0	1	5	2	0
V2T21	Sabor	3	7	0	0	0	0
	Color	0	1	2	3	4	0
	Aroma	2	0	5	2	1	0
V2P17	Sabor	0	0	6	1	2	1
	Color	0	0	1	2	4	3
	Aroma	1	3	0	5	1	0
V2T17	Sabor	6	3	0	1	0	0
	Color	0	0	2	2	6	0
	Aroma	2	1	3	3	1	0

El color fue el parámetro mejor evaluado en todos los casos, obteniéndose valores de puntuación entre 3.3-5.1, es decir, los catadores evaluaron el color de todos los vinos de forma aceptable-deseable.

La Figura 4.44 muestra los valores medios de las puntuaciones de color obtenidas por los vinos elaborados, los vinos que mejores puntuaciones recibieron fueron los de fermentación parcial a ambas temperaturas. El vino que mejor puntuación recibió fue el V1P17 (5.4 puntos), seguido por el vino V1P21 (5.1 puntos). Los vinos 2 de fermentación total obtuvieron mejores puntuaciones que los correspondientes vinos 1, teniendo como puntuación 4-4.4 para los primeros y 3.2-3.3 para los segundos, de temperaturas 21 y 17°C, respectivamente.

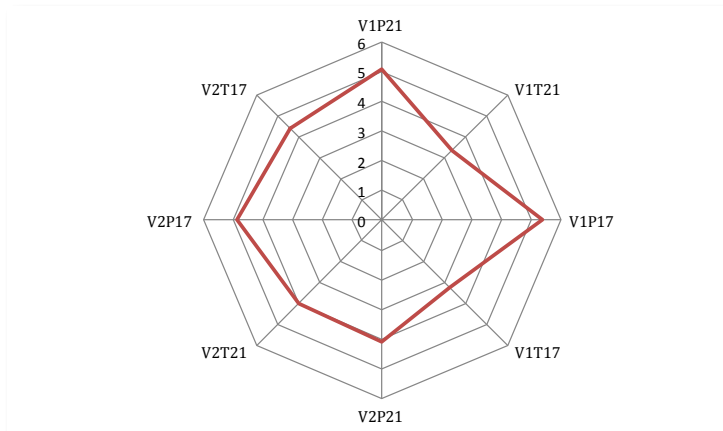


Figura 4.44. Puntuaciones del análisis de color de los vinos elaborados.

Las puntuaciones obtenidas respecto al sabor de los vinos se muestran en la Figura 4.45. En este caso, al igual que en el color, los vinos de fermentación parcial, es decir, los vinos dulces de ambas temperaturas y ambas proporciones, obtuvieron mayor puntuación que los vinos secos obtenidos por fermentación total. Además, los catadores puntuaron a los vinos de 21°C de forma más positiva que los obtenidos de la misma forma a 17°C. El vino V1P21 recibió la mejor puntuación, (deseable 5 puntos), seguido del vino de fermentación parcial 2:1 (aceptable 4.5). Por otro lado, los vinos obtenidos por fermentación total, eran los que peor sabor presentaron, recibiendo los vinos 1 de ambas temperaturas 2.3 puntos (indeseable-aceptable bajo) y los vinos 2, 1.7 puntos (temperatura 21°C) y 1.6 puntos (temperatura 17°C) (indeseables).

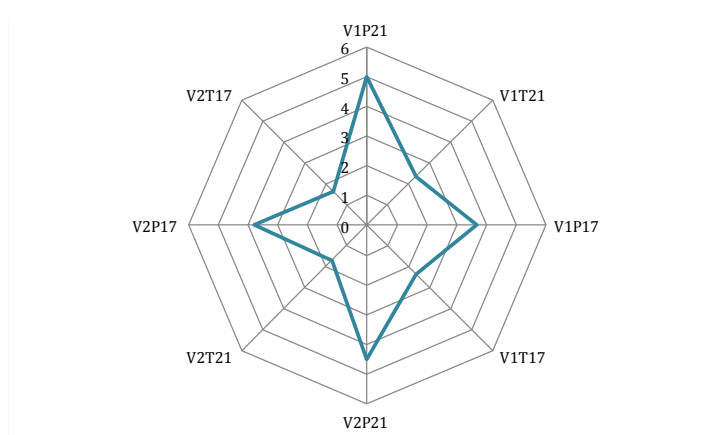


Figura 4.45. Puntuaciones del análisis de sabor de los vinos de arándanos.

Por tanto, se puede afirmar que los vinos obtenidos por fermentación total a ambas temperaturas no son aceptados por los consumidores, lo que puede deberse a la ausencia final de azúcares residuales que enmascaran en menor o mayor medida la acidez de los vinos de fermentación total.

El aroma fue otro de los parámetros que los catadores puntuaron. En la Figura 4.46 se pueden ver las diferentes puntuaciones obtenidas para todos los vinos elaborados.

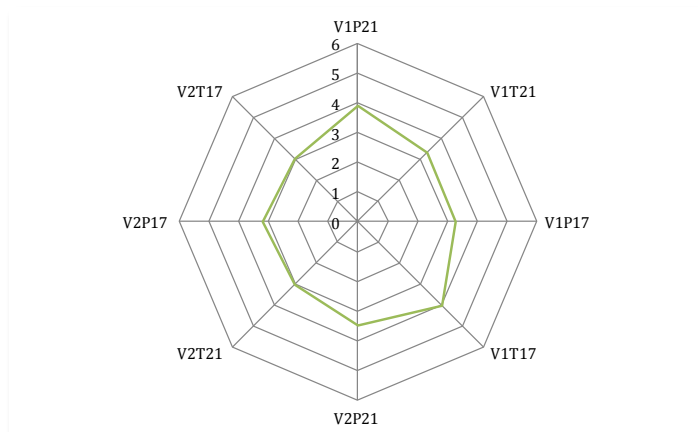


Figura 4.46. Puntuaciones del análisis del aroma de los vinos de arándanos elaborados.

A modo de resumen y para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, se calculó la media de las puntuaciones de cada parámetro (sabor, color y aroma) de los diferentes vinos (Figura 4.47).

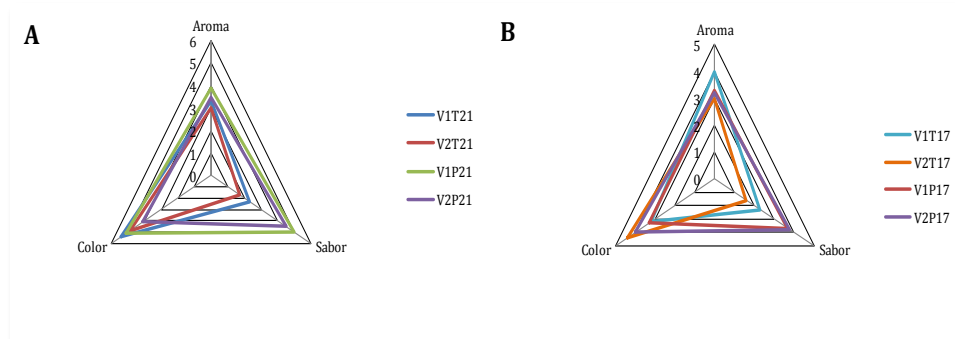


Figura 4.47. Puntuaciones del análisis sensorial de los vinos 1 y 2 elaborados a 21 °C (A) y 17 °C (B)

En general, los vinos recibieron puntuación entre 3-4 (deseable). De igual forma, que en gusto y color, los vinos de fermentación parcial, obtuvieron mayor puntuación que los vinos de fermentación total, excepto en el caso del vino V1T17 que obtuvo mayor puntuación que el mismo elaborado por fermentación parcial y además fue el que mayor puntuación recibió de todos (4 puntos). A este vino le siguió, el vino V1P21 con una puntuación de 3.9 y el vino V2P21 3.5 puntos.

A modo de conclusión, se puede decir que a razón de las puntuaciones obtenidas en la prueba de aceptación de los productos por parte del consumidor, según el color, aroma y gusto, los vinos mejor puntuados fueron siempre los vinos elaborados con fermentación parcial y a mayor temperatura.

3.7.2. Prueba triangular

Se realizó una prueba triangular con vinos de igual tiempo de fermentación y misma proporción (fruto/disolución azucarada) pero distinta temperatura de fermentación, con el objetivo de comprobar si los catadores eran capaces de diferenciar los vinos elaborados a 21°C y 17°C con el mismo tiempo de fermentación. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 4.22.

Tabla 4.22. Resultados de la prueba triangular llevada a cabo con los vinos de arándanos elaborados. Se indican el número de catadores que encontraron (Si) y que no encontraron (No) la muestra diferente.

	SI	NO
V1P21 y V1P17	7	3
V1T21 y V1T17	4	6
V2P21 y V2P17	6	4
V2T21 y V2T17	4	6

Los resultados muestran que los jueces consiguieron diferenciar mejor los vinos de fermentación parcial de ambas temperaturas, que los elaborados por fermentación total, siendo los vinos que mejor diferenciaron los jueces los V1P. Los vinos V1T21, V1T17, V2T21 y V2T17 fueron los que más costó diferenciar a

los catadores, como se puede observar en la Tabla. De esta forma, se puede considerar que, aunque los vinos se desarrollaron a diferentes temperaturas, presentaron tras su elaboración características organolépticas similares.

4. Conclusiones/Conclusions

Conclusiones

1. En relación a los zumos de partida destinados a la elaboración de vinos de arándano se puede concluir:

1.1. Ambos zumos de partida presentaron un valor de pH bajo, no afectando negativamente al proceso de fermentación. El valor de acidez volátil de ambos zumos fue adecuado para la elaboración de bebidas.

1.2. Una mayor proporción de fruto produjo zumos con mayores valores de absorbancias a 520 y 620 nm, de aproximadamente el doble, y mayor contribución en el color de compuestos poliméricos. Todos los zumos mostraron mayor contribución de tonos rojos que la de tonos pardos.

1.3. En el zumo preparado con mayor proporción de fruto se pudieron cuantificar mayor número de antocianinas, mostrando una concentración total de esta familia de compuestos fenólicos 4 veces superior. El antociano mayoritario en todos los casos fue malvidín-3-*O*-galactósido.

1.4. En el zumo con menor proporción de fruto se identificaron 5 compuestos derivados de flavan-3-ol, epigallocatequín-3-*O*-galato, epigallocatequina, (+)-catequina, (-)-epicatequina y procianidina B1. Mientras que en el otro caso se cuantificó además la procianidina B2. Además en ambos zumos se identificaron y cuantificaron 4 flavonoles, siendo la concentración de esta familia en el zumo con más proporción de fruto 1.35 veces mayor.

1.5. El zumo preparado con mayor contenido de fruto presentó mayor cantidad de taninos y vitamina C, y por lo tanto mayor valor de actividad antioxidante.

2. En relación al proceso de fermentación y la influencia del tiempo de fermentación en la elaboración de vinos de arándano se puede concluir:

2.1. En general, un mayor tiempo de fermentación produjo una disminución del pH. La acidez volátil aumentó con el tiempo de fermentación siendo el valor de esta mayor en los vinos elaborados con la menor proporción de fruto (vinos 1) que en aquellos que se elaboraron una proporción de fruta mayor (vinos 2).

2.2. El proceso de fermentación aumentó el contenido en antocianinas de los zumos elaborados con la menor proporción de fruto (vinos 1). Sin embargo, en los vinos 2 se produjo un descenso en el total de antocianinas durante el proceso de fermentación. Tiempos de fermentación más cortos produjo vinos con mayor contenido de antocianinas.

2.3. El proceso de fermentación aumentó la concentración de compuestos derivados de flavan-3-ol en todos los casos. Además, con un tiempo de fermentación menor se elaboraron vinos con mayor concentración de estos compuestos.

2.4. El contenido de flavonoles en los vinos 1 aumentó con el tiempo de fermentación. Sin embargo, en los vinos 2, la concentración de flavonoles fue mayor en aquellos vinos con menor tiempo de fermentación.

2.5. En todos los casos, la concentración de taninos totales sufrió un descenso importante durante el proceso de fermentación, siendo esta disminución mayor al aumentar el tiempo de fermentación.

2.6. El proceso de fermentación produjo una disminución en los valores de vitamina C. Además, el contenido de vitamina C total fue mayor al aumentar el tiempo de fermentación, notándose un incremento de la forma reducida de esta vitamina con el tiempo de fermentación.

2.7. En general, la actividad antioxidante aumentó con el proceso de fermentación, siendo este aumento mayor con menores tiempos de fermentación.

2.8. El proceso de fermentación produjo un aumento de las absorbancias a 420 y 520 nm, desde los zumos a los vinos. Los valores más altos se obtuvieron en los vinos fermentados un menor tiempo. El color de pigmentos poliméricos aumentó respecto de los zumos iniciales, siendo este valor, generalmente, mayor en los vinos de fermentación total.

3. En relación a la influencia de la temperatura en la elaboración de vinos de arándano se puede concluir:

3.1. En los vinos elaborados con el zumo con menor proporción de fruto (vinos 1), una menor temperatura produjo vinos con un pH mayor. No obstante, en los vinos 2, los vinos elaborados a menor temperatura presentaron valores de pH menores. Además, la acidez volátil fue mayor en los vinos fermentados a 21 °C respecto de los respectivos fermentados a 17 °C en todos los casos.

3.2. En lo que respecta a la concentración de antocianinas, en los vinos fermentados parcialmente, en general, una temperatura de fermentación más alta produjo una mayor extracción de todas las familias de derivados de las antocianinas. Por otro lado, en el caso de los vinos que se obtuvieron mediante fermentación total, los vinos elaborados a menor temperatura fueron los que presentaron mayor cantidad de derivados arabinósidos, glucósidos y galactósidos.

3.3. Una mayor temperatura de fermentación produjo vinos con mayor concentración de compuestos derivados de flavan-3-ol y de flavonoles en todos los casos.

3.4. En general, la concentración de taninos aumentó con la temperatura de fermentación. Por otro lado, la vitamina C aumentó con la temperatura de

fermentación en los vinos 1, sin embargo, en los vinos 2, una mayor temperatura produjo vinos con menor contenido en esta vitamina.

3.6. En general, una mayor temperatura de fermentación produjo vinos con mayores valores de actividad antioxidante.

3.7. Los vinos obtenidos a una temperatura más alta fueron en general, más rojos y más pardos que los obtenidos a menor temperatura. Siendo también mayor el color de pigmentos de poliméricos a mayor temperatura.

4. En lo que respecta a la influencia de los tratamientos postfermentativos en los vinos elaborados se puede concluir:

4.1. El tratamiento con bicarbonato potásico provocó cambios en los valores de pH de entre 0.4 y 0.6 unidades. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de pH cuando se añadió el metabisulfito potásico.

4.2. La adición de metabisulfito potásico y de bicarbonato potásico, afectó al color causando una disminución de las absorbancias a 520 y 420nm de todos los vinos y aumentando el valor de color de los pigmentos poliméricos.

4.3. La concentración de los derivados de flavan-3-ol, flavonoles y antocianos se vio afectada por los tratamientos postfermentativos, produciéndose en general una disminución de la concentración de estos compuestos.

4.4. La adición de metabisulfito potásico y de bicarbonato potásico no modificó la concentración de vitamina C y de taninos totales.

4.5. La actividad antioxidante no mostró cambios con los tratamientos postfermentativos.

5. En relación al análisis sensorial se puede concluir:

5.1. Los vinos mejor puntuados según el color, aroma y gusto, fueron aquellos que se elaboraron mediante fermentación parcial y a mayor temperatura.

5.2. Según la prueba triangular, los jueces fueron capaces de diferenciar mejor los vinos fermentados parcialmente a las distintas temperaturas empleadas.

Conclusions

1. In relation to the initial juices destined to the elaboration of blueberry wines, it can be concluded:

1.1. Both initial juices presented a low pH value, not negatively affecting the fermentation process. The volatile acidity value of both juices was adequate for the production of beverages.

1.2. A higher proportion of fruit produced juices with higher absorbance values at 520 and 620 nm of approximately double and greater contribution in the color of polymeric compounds. All the juices showed greater contribution of red tones than the one of brown tones.

1.3. In the juice prepared with a higher proportion of fruit, a greater number of anthocyanins could be quantified, showing a total concentration of this family of phenolic compounds 4 times higher. The majority anthocyanin in all cases was malvidin-3-*O*-galactoside.

1.4. In the juice with the lowest proportion of fruit, 5 compounds derived from flavan-3-ol, epigallocatechin-3-*O*-gallate, epigallocatechin, (+)-catechin, (-)-epicatechin and procyanidin B1, were identified and quantified. While in the other case, procyanidin B2 was also quantified. In addition, in both juices, 4 flavonols were identified and quantified, with the concentration of this family in the juice with the highest proportion of fruit 1.35 times greater.

1.5. The juice prepared with a higher fruit content presented a greater amount of tannins and vitamin C, and therefore a higher value of antioxidant activity.

2. In relation to the fermentation process and the influence of the fermentation time in the production of blueberry wines, it can be concluded:

2.1. In general, a longer fermentation time produced a decrease in pH. The volatile acidity increased with the fermentation time being this value higher in the wines elaborated with the smaller proportion of fruit (wines 1) than in those that elaborated a proportion of greater fruit (wines 2).

2.2. The fermentation process increased the anthocyanin content of the juices made with the lowest proportion of fruit (wines 1). However, in wines 2, there was a decrease in total anthocyanins during the fermentation process. Shorter fermentation times produced wines with higher anthocyanin content.

2.3. In all cases, the fermentation process increased the concentration of compounds derived from flavan-3-ol. In addition, with a shorter fermentation time, wines with a higher concentration of these compounds were elaborated.

2.4. The content of flavonols in wines 1 increased with fermentation time. However, in wines 2, the concentration of flavonols was higher in those wines with less fermentation time.

2.5. In all cases, the concentration of total tannins suffered a significant decrease during the fermentation process. This decrease was greater when the fermentation time increased.

2.6. The fermentation process produced a decrease in the values of vitamin C. In addition, the total vitamin C content was higher when fermentation time longer, noting an increase in the reduced form of this vitamin with the time of fermentation.

2.7. In general, the antioxidant activity increased with the fermentation process, this increase was greater with shorter fermentation times.

2.8. The fermentation process produced an increase in absorbances at 420 and 520 nm, from juices to wines. The highest values were obtained in the fermented wines a shorter time. The color of polymeric pigments increased with respect to the initial juices, being this value, generally, higher in the wines of total fermentation.

3. In relation to the influence of temperature in the production of blueberry wines can be concluded:

3.1 In wines made with the juice with the lowest proportion of fruit (wines 1), a lower temperature produced wines with a higher pH. However, in wines 2, wines made at a lower temperature had lower pH values. In addition, in all cases, the volatile acidity was higher in wines fermented at 21 ° C compared to the respective fermented at 17 ° C.

3.2. Regarding the concentration of anthocyanins, in general, partially fermented wines showed that a higher fermentation temperature produced a greater extraction of all families of anthocyanin derivatives. On the other hand, in the case of wines that were obtained through total fermentation, wines obtained at a lower temperature were those that presented the greatest amount of arabinoside derivatives, glycosides and galactosides.

3.3. In all cases, a higher fermentation temperature produced wines with a higher concentration of compounds derived from flavan-3-ol and flavonols.

3.4. In general, the concentration of total tannins increased with the fermentation temperature. On the other hand, vitamin C increased with fermentation temperature in wines 1, however, in wines 2, a higher temperature produced wines with lower content of this vitamin.

3.6. In general, a higher fermentation temperature produced wines with higher values of antioxidant activity.

3.7. The wines obtained at higher temperature were generally redder and more yellow than those obtained at a lower temperature. The color of polymeric pigments at higher temperature was also greater.

4. With regard to the influence of post-fermentation treatments on elaborated wines, it can be concluded:

4.1. The treatment with potassium bicarbonate caused changes in the pH values between 0.4 and 0.6 units. However, no significant differences were found between pH values when potassium metabisulfite was added.

4.2. The addition of potassium metabisulfite and potassium bicarbonate, affected the color causing a decrease in absorbances at 520 and 420nm of all wines and increasing the color value of polymeric pigments.

4.3. The concentration of the compounds derivatives from flavan-3-ol, flavonols and anthocyanins was affected by the post-fermentation treatments, producing in general a decrease in the concentration of these compounds.

4.4. The addition of potassium metabisulfite and potassium bicarbonate did not modify the concentration of vitamin C and total tannins.

4.5. Antioxidant activity showed no changes with post-fermentation treatments.

5. In relation to the sensory analysis it can be concluded:

5.1. The best wines scored according to color, aroma and taste, were those that were elaborated by partial fermentation and higher temperature.

5.2. According to the triangular test, the judges were able to better differentiate partially fermented wines at the different temperatures used.

ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO DE VINOS DE ARÁNDANO EN BOTELLA

1. Introducción

El lanzamiento al mercado de un producto nuevo, en este caso vino de arándano, necesita un estudio exhaustivo de la evolución del mismo para comprobar su estabilidad, ya que si no se podrían presentar graves problemas de venta y marketing. Existen numerosos estudios realizados sobre la evolución de la composición de los vinos de uva (Zafrilla et al., 2003; Mulero et al., 2009; Mateus et al., 2005; Ho et al., 2001; Gómez-Plaza et al., 2000). Sin embargo, en la bibliografía los estudios de la evolución en botella de vinos de frutas son escasos, por lo que servirá de referencia los estudios realizados para vinos tintos y la experiencia en este sentido del equipo de investigación (Marquez et al., 2014).

Para definir la calidad de los vinos tintos los compuestos fenólicos son muy importantes debido a la influencia de los mismos en las propiedades organolépticas como el color, la astringencia y el amargor, así como la capacidad de envejecimiento (Soto Vázquez et al., 2010). Los compuestos que más intervienen en estas propiedades son las antocianinas, los flavanoles y las formas poliméricas resultantes entre los antocianos y los polímeros de flavanoles. Los primeros son los responsables del color rojo mientras que los flavanoles y los pigmentos poliméricos, del amargor y la astringencia.

Es bien conocido que durante la evolución de los vinos tintos de uva, se producen cambios importantes en la composición fenólica, apareciendo otros compuestos que se caracterizan por ser más estables y presentar estructuras más complejas (Cruz et al., 2008). Los vinos de uva evolucionan a color teja-anaranjando (Zamora et al., 2003) y ocurre una clarificación espontánea como se muestra en las gráficas de evolución de los espectros de absorbancia con el tiempo (Figura 5.1).



Figura 5.1. Evolución del color del vino tinto de uva a lo largo del tiempo de envejecimiento

Algunos de los factores que más afectan al progreso de las reacciones químicas de los compuestos fenólicos durante el envejecimiento del vino son la concentración de antocianos, copigmentos, acetaldehído, además de otros metabolitos de las levaduras, así como el pH, la temperatura y la presencia de oxígeno y dióxido de azufre, entre otros (Romero and Bakker, 2000).

Uno de los atributos más importantes de una bebida es el color. El color inicial de los vinos tintos, se debe principalmente a los antocianos que se extraen desde las pieles de los frutos durante el proceso de vinificación, como ya se explicado anteriormente. Sin embargo, durante el almacenamiento posterior, o

envejecimiento, ocurren numerosas reacciones que pueden modificarlo. Entre estas reacciones, se encuentran procesos de oxidación, copigmentación, cicloadición, condensación o polimerización e incluso los antocianos pueden reaccionar con derivados del flavan-3-ol o flavanoles (Dallas et al., 1996b; Francia-Aricha et al., 1997; Vivar-Quintana et al., 2002). Asimismo, los flavanoles están involucrados en reacciones de pardeamiento oxidativo, a la vez que interaccionan con las proteínas originando una turbidez en el vino (Cheynier and Ricardo da Silva, 1991). En conjunto, las reacciones anteriormente citadas, modifican el color del vino durante el período de envejecimiento, dando lugar a un descenso en astringencia y amargor, resultando finalmente vinos más suaves en comparación con los vinos jóvenes de procedencia.

En este estudio, se pretende evaluar cuales fueron las condiciones de elaboración más adecuadas para realizar un procedimiento de envejecimiento de vino de arándano, para ello se realizó un seguimiento en el tiempo de la concentración de antocianinas, parámetros de color y actividad antioxidante.

2. Material experimental

Para este estudio se utilizan los vinos obtenidos en el capítulo anterior (V1P17, V1P21, V1T17, V1T21, V2P17, V2P21, V2T17, V2T21). La Figura 5.2 muestra un esquema del proceso seguido en la elaboración y posterior almacenamiento de los vinos obtenidos.

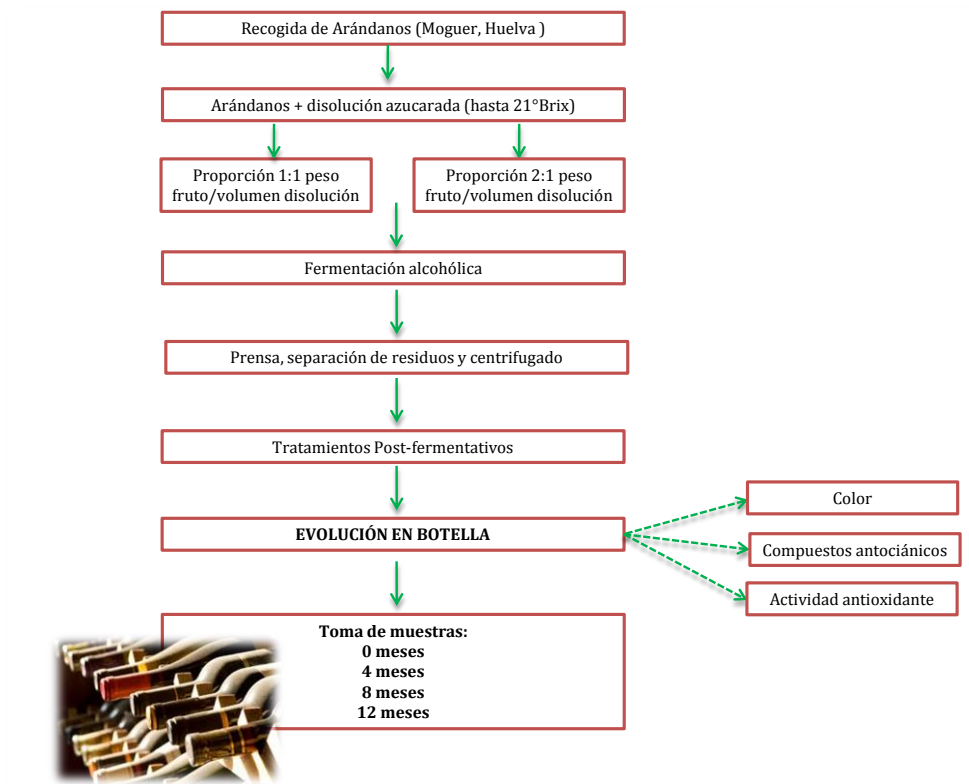


Figura 5.2. Esquema del proceso de obtención de bebidas y seguimiento en botella de los vinos obtenidos.

Como se comentó anteriormente, los vinos fueron elaborados con arándanos de la variedad Windsor cultivados en Moguer (Huelva) de la cosecha del año 2015. Los arándanos se estrujaron junto a una disolución azucarada hasta conseguir un zumo de 21 °Brix. Las mezclas se hicieron en dos proporciones, una de ellas 1:1 (peso/volumen, fruto/disolución azucarada) que se denominaron Vinos 1 (V1) y la otra en proporción 2:1, Vinos 2 (V2). Tras preparar las mezclas, se preparó el inóculo de levadura *saccharomyces cerevisiae* CT 007 (0.3 g/L) según las recomendaciones del proveedor, y este se añadió al zumo azucarado para el comienzo de la fermentación alcohólica. Las mezclas se dividieron en lotes de 500 mL introducidos en matraces de 1L. Dos de los matraces de cada proporción, se dejaron fermentar totalmente (V1T y V2T) mientras que en otros dos se detuvo la fermentación cuando el grado alcohólico alcanzó entre 6 y 7 % v/v y se añadió alcohol vínico hasta 12-13% v/v para igualar con el grado alcohólico de las bebidas de fermentación total (V1P y V2P). Cada fermentación se realizó a dos temperaturas diferentes 17 y 21 °C.

Tras las fermentaciones, la masa de fermentación fue prensada, separando el líquido de los sólidos restantes y por último se centrifugaron a 3000 rpm. Debido a que los arándanos son frutos bastante ácidos, las bebidas obtenidas también lo fueron, con lo que para mejorar las cualidades organolépticas de las mismas, se corrigió la acidez con bicarbonato potásico (E-501) de uso alimentario (1 g/L, dosis límite: 1.3 g/L; según el Reglamento (CE nº 479/2008). Además, se añadió metabisulfito potásico (E-224) de uso vínico a modo de conservante (150 mg/L).

Las bebidas corregidas se mantuvieron en reposo 24 horas antes de su embotellado en botellas bordelesas de vidrio verde con tapones de corcho estándar UNE-EN-12726-18,5mm. Las botellas fueron etiquetadas y conservadas en ausencia de luz a 4°C durante 12 meses. Todas las determinaciones se realizaron en el momento inicial de estudio y cada cuatro meses, obteniendo para cada tipo de vino medidas a tiempo cero y tras 4, 8 y 12 meses de estabilización en botella. Previamente a su análisis, el vino de cada botella fue centrifugado a 3000 rpm y filtrado, realizando todas las determinaciones por triplicado.

3. Resultados y discusión

3.1. Evolución del pH

El pH es un parámetro indicativo del estado del vino e influye sobre la evolución del color del vino de uva con el tiempo (Santos et al., 2016), ya que podría definir la velocidad de oxidación de algunos compuestos y el deterioro organoléptico. Uno de los puntos a tener en cuenta, es que si el pH aumenta demasiado con el tiempo de almacenamiento existe una mayor posibilidad de oxidación del vino durante el almacenamiento porque se vería favorecida la formación de quinonas (pk entre 9-10), y habría pérdida de color rojo. Por otro lado, el equilibrio de las distintas formas del SO₂ está condicionado por el pH, de modo que a mayor pH, menor SO₂ libre, y por tanto menor acción antioxidante, conservante, etc... Los valores de pH de los vinos de arándanos a los 0, 4, 8 y 12 meses de estabilización en botella se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Valores de pH de los vinos de arándano a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento.

	0 meses	4 meses	8 meses	12 meses
V1P21	3.21±0.010 ^a	3.06±0.015 ^b	3.15±0.023 ^c	3.15±0.021 ^c
V1T21	3.13±0.000 ^a	3.12±0.010 ^a	3.13±0.006 ^a	3.16±0.010 ^b
V1P17	3.44±0.010 ^a	3.34±0.035 ^b	3.32±0.006 ^b	3.32±0.006 ^b
V1T17	3.32±0.015 ^a	3.28±0.006 ^b	3.24±0.023 ^c	3.24±0.015 ^c
V2P21	3.16±0.015 ^a	3.16±0.010 ^b	3.18±0.015 ^{bc}	3.19±0.006 ^c
V2T21	3.32±0.010 ^a	3.13±0.010 ^b	3.15±0.010 ^c	3.16±0.006 ^c
V2P17	3.03±0.010 ^a	3.22±0.006 ^b	3.22±0.010 ^b	3.29±0.032 ^c
V2T17	2.82±0.000 ^a	3.32±0.029 ^b	3.26±0.044 ^c	3.21±0.006 ^c

Como puede observarse, los valores de pH de todos los vinos estuvieron dentro de los valores normales, con lo que se podría afirmar que la forma de almacenamiento y la temperatura, podrían ser adecuadas para almacenar los vinos de arándano obtenidos. La mayoría de los vinos, presentaron diferencias significativas respecto al vino de 0 meses, no encontrándose tantas diferencias entre los vinos a los 4, 8 y 12 meses de almacenamiento.

3.2. Evolución del color

El tiempo y la temperatura del almacenamiento son dos de los factores que afectan al color del vino, ya que muchos de los cambios que ocurren durante el almacenamiento, son dependientes del tiempo y se pueden producir degradación de pigmentos y polimerizaciones según sea la temperatura (Gómez-Plaza et al., 2000). La temperatura de almacenamiento en este estudio fue constante, como se ha explicado anteriormente, estudiando únicamente la evolución del color frente al tiempo.

Los valores de absorbancias a 520 nm (tomados como la contribución de tonos rojos), 420 nm (tonos pardos) y 620 nm (tonos azulados-violáceos) de los diferentes vinos durante el periodo de almacenamiento se muestran en la Figura 5.3.

Las Figuras 5.3A y 5.3B muestran la evolución de los tonos rojos y pardos respectivamente de los vinos de arándano estudiados durante los doce meses de almacenamiento. Ambas absorbancias presentaron un comportamiento similar durante todo el periodo. Desde los 0 a los 4 meses, los tonos rojos y los pardos sufrieron el cambio más importante en el color. A partir de los 4 meses, las dos absorbancias se mostraron prácticamente estables. Esto puede ser debido a que las reacciones que involucran a los compuestos coloreados avanzan rápidamente en los primeros meses de almacenamiento modificando el color, una vez que la concentración de reactivos disminuye los cambios en el color son menores.

En las dos Figuras se puede comprobar además que todos los vinos, excepto en los vinos 2 de fermentación parcial y total obtenidos a 17 °C (V2P17 y V2T17), tenían menores valores de estas absorbancias a los 4, 8 y 12 meses, respecto del vino de 0 meses de almacenamiento.

Respecto a la absorbancia a 620 nm (Figura 5.3C), es de destacar que los vinos iniciales no mostraron valores de esta absorbancia, sin embargo se produjo un aumento durante los primeros 8 meses, aunque con valores bajos, disminuyendo de nuevo a los 12 meses. Este hecho podría ser debido un desplazamiento batocrómico producido por reacciones de condensación de antocianos con flavonoles (reacción de copigmentación antociano-flavonol) (Mateus et al, 2005; Hermosín Gutierrez et al., 2007) y/o con otros compuestos. Como consecuencia ocurre un desplazamiento en el máximo de absorción, dando lugar a tonalidades rojo-azuladas (Alcalde-Eon et al 2006).

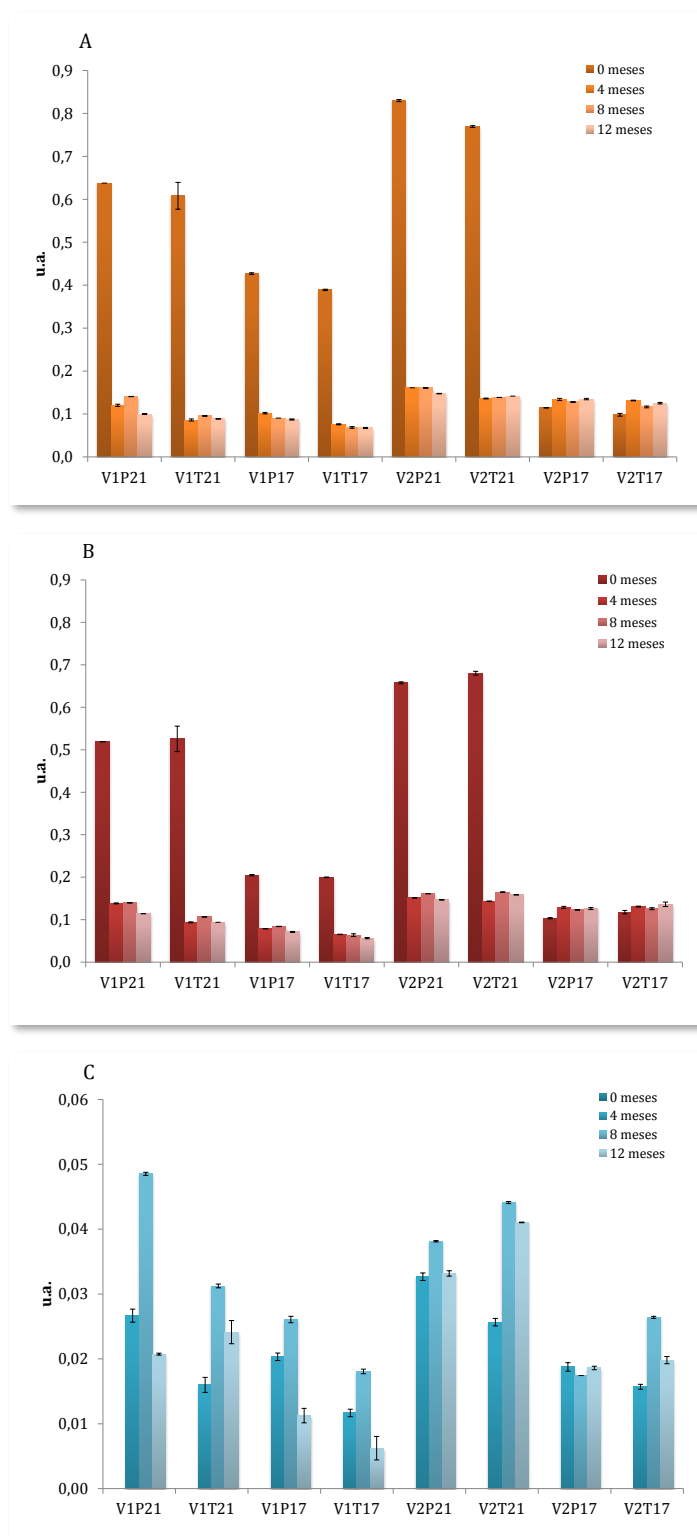


Figura 5.3. Evolución de las absorbancias a 520 (A), 420 (B) y 620 (C) nm (media y desviación estándar) de los vinos de arándano a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento.

A partir de los valores de absorbancia anteriores se calcularon los porcentajes de color amarillo y rojo de cada uno de los vinos tal y como se muestra en la Figura 5.4. Como se puede observar, de forma general el porcentaje del color rojo aumentó con el tiempo de almacenamiento. Todos los vinos, excepto el vino V2T17, presentaron mayor contribución de tonos pardos que rojos antes de ser embotellados. Sin embargo, se puede comprobar que a partir de los 4 meses, los vinos eran generalmente más rojos que pardos, con lo que este hecho puede evidenciar la formación de otros compuestos no identificados ni cuantificados en este trabajo que aporten color rojo a los vinos de arándano, como son las vitisinas (Marquez et al., 2012), polímeros coloreados a partir de taninos (He et al., 2008; Nave et al., 2010), etc.

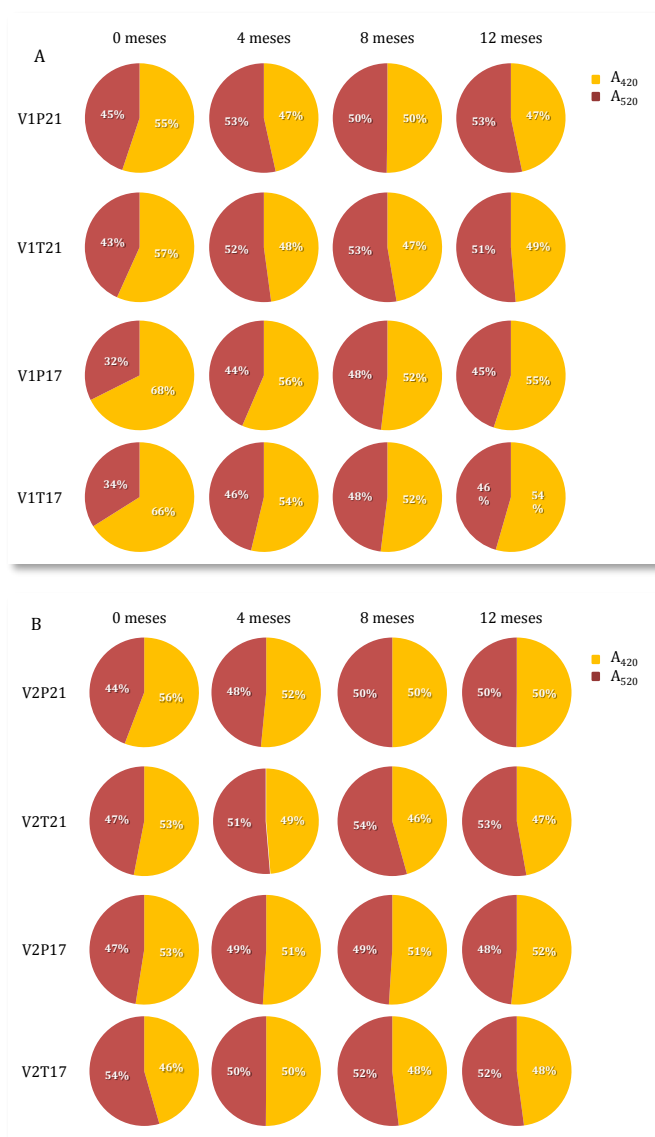


Figura 5.4. Evolución de los porcentajes de color amarillo y rojo de los vinos 1 (A) y vinos 2 (B) a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento.

Por otro lado, desde el punto de vista de calidad de un vino, sería interesante conocer si la intensidad colorante de los vinos en estudio se mantiene en el tiempo, ya que este parámetro nos puede indicar si la cantidad de color de un vino es estable, lo cual es importante a la hora de comercializar este tipo de productos.

La Tabla 5.2 muestra los valores de intensidad colorante obtenida como la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm de los vinos durante el periodo de almacenamiento. Se puede observar que la intensidad decreció mucho entre los 0 y 4 meses, lo que sí está de acuerdo con lo encontrado con otros autores. Gómez-Plaza et al. (2000) encontraron que la intensidad del color de vinos de uva decreció de los 0 a los 3 meses. Sin embargo, estos autores encontraron un aumento a partir de los tres hasta los 12 meses de envejecimiento, lo que no estaría totalmente de acuerdo con los vinos de este trabajo.

Tabla 5.2. Intensidad colorante (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los vinos obtenidos a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento en botella.

		0 meses	4 meses	8 meses	12 meses
Vinos 1	V1P21	1.16±0.057 ^a	0.180±0.004 ^{bc}	0.202±0.000 ^c	0.183±0.000 ^b
	V1T21	1.13±0.000 ^a	0.259±0.000 ^b	0.280±0.000 ^c	0.214±0.000 ^b
	V1P17	0.632±0.002 ^a	0.141±0.002 ^b	0.132±0.000 ^c	0.124±0.003 ^d
	V1T17	0.589±0.004 ^a	0.181±0.001 ^b	0.174±0.001 ^c	0.158±0.002 ^d
Vinos 2	V2P21	1.49±0.007 ^a	0.279±0.001 ^b	0.303±0.000 ^c	0.300±0.000 ^d
	V2T21	1.45±0.005 ^a	0.312±0.001 ^b	0.322±0.001 ^c	0.294±0.001 ^c
	V2P17	0.218±0.003 ^a	0.262±0.001 ^b	0.242±0.000 ^c	0.261±0.004 ^b
	V2T17	0.216±0.002 ^a	0.263±0.002 ^b	0.251±0.004 ^c	0.261±0.001 ^b

Se puede observar que la intensidad decreció mucho entre los 0 y 4 meses en los vinos 1, sin embargo, los vinos 2 obtenidos a 17°C tanto de fermentación parcial como total, fueron los únicos que mostraron que la intensidad colorante aumentó de los 0 a 4 meses. En el resto del envejecimiento (4 a 12 meses) de los vinos la intensidad colorante no varió significativamente, como se puede observar en la Figura 5.5. Este hecho es de gran importancia, ya que aseguraría el color de los vinos en el tiempo durante su periodo de almacenamiento y venta.

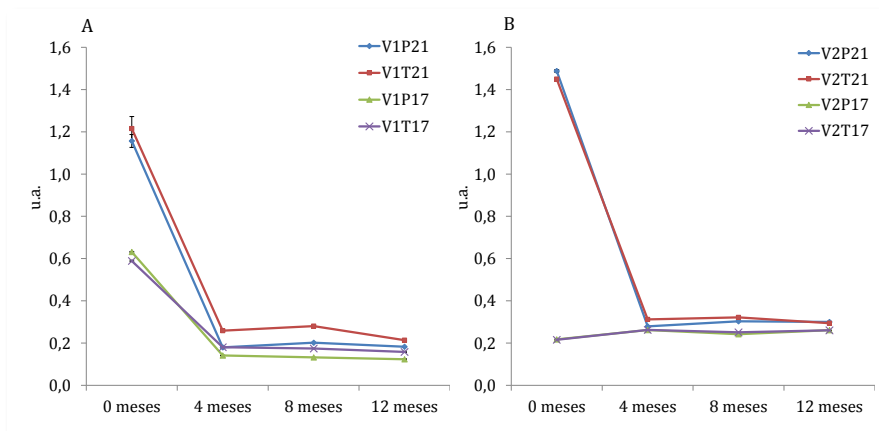


Figura 5.5. Evolución de la intensidad colorante (media y desviación estándar) de los vinos 1 (A) y vinos 2 (B) durante el envejecimiento.

La evolución y estabilización del color de los vinos tintos de uva han sido atribuidas clásicamente a la formación de pigmentos poliméricos, lo cual permite explicar la disminución de la intensidad colorante de los vinos, ya que al ser compuestos de alto grado de polimerización, terminan precipitando por la insolubilización en el vino. Por otro lado, la desaparición del fenómeno de copigmentación (por la disminución de los antocianos monómeros) explicaría también la disminución y estabilización de la intensidad colorante, ya que desaparecería el efecto batocrómico (Hermosín Gutierrez et al., 2007). En el caso de los vinos en estudio, el cambio más brusco en la intensidad colorante, se produjo entre los 0 y 4 meses. A partir de los 4 meses, la intensidad colorante permaneció prácticamente constante, lo cual se podría deber a lo explicado anteriormente y, a que los pigmentos poliméricos T-A (tanino-antociano), no se afectan por los sulfitos, ya que tienen la posición C-4 del anillo de pirano del antociano bloqueada, posición por donde podría reaccionar el sulfito, por lo que este tipo de pigmento si es estable. En el caso de los pigmentos tipo A-T, aún mantienen libre esta posición y podrían decolorarse.

3.3. Evolución de las antocianinas

Como se ha explicado anteriormente, los antocianos son unos de los compuestos responsables del color rojo de los vinos, y estos compuestos contribuyen al desarrollo de pigmentos poliméricos durante el envejecimiento de los vinos (Versari et al., 2008). Durante la fermentación, y durante los primeros años de maduración de los vinos, el contenido de antocianinas disminuye debido a una gran variedad de reacciones y asociaciones de compuestos, que resultan en nuevos pigmentos derivados de antocianos, que son extremadamente cruciales para la estabilidad del color de las bebidas (He et al., 2012). Por este motivo, se llevó a cabo el estudio del comportamiento de las antocianinas durante el almacenamiento de los vinos en botella.

Los cromatogramas de las antocianinas a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento se muestran en la Figura 5.6. En los vinos de fermentación parcial se pudieron

identificar y cuantificar los tres derivados de la malvidina mayoritarios encontrados en los vinos, el malvidín-3-galactósido, el malvidín-3-*O*-glucósido y el malvidín-3-arabinósido a los 12 meses de almacenamiento. Sin embargo, en los cromatogramas de los vinos de fermentación total, se puede apreciar que no se pudo identificar ni cuantificar ningún antociano monómero a los 12 meses.

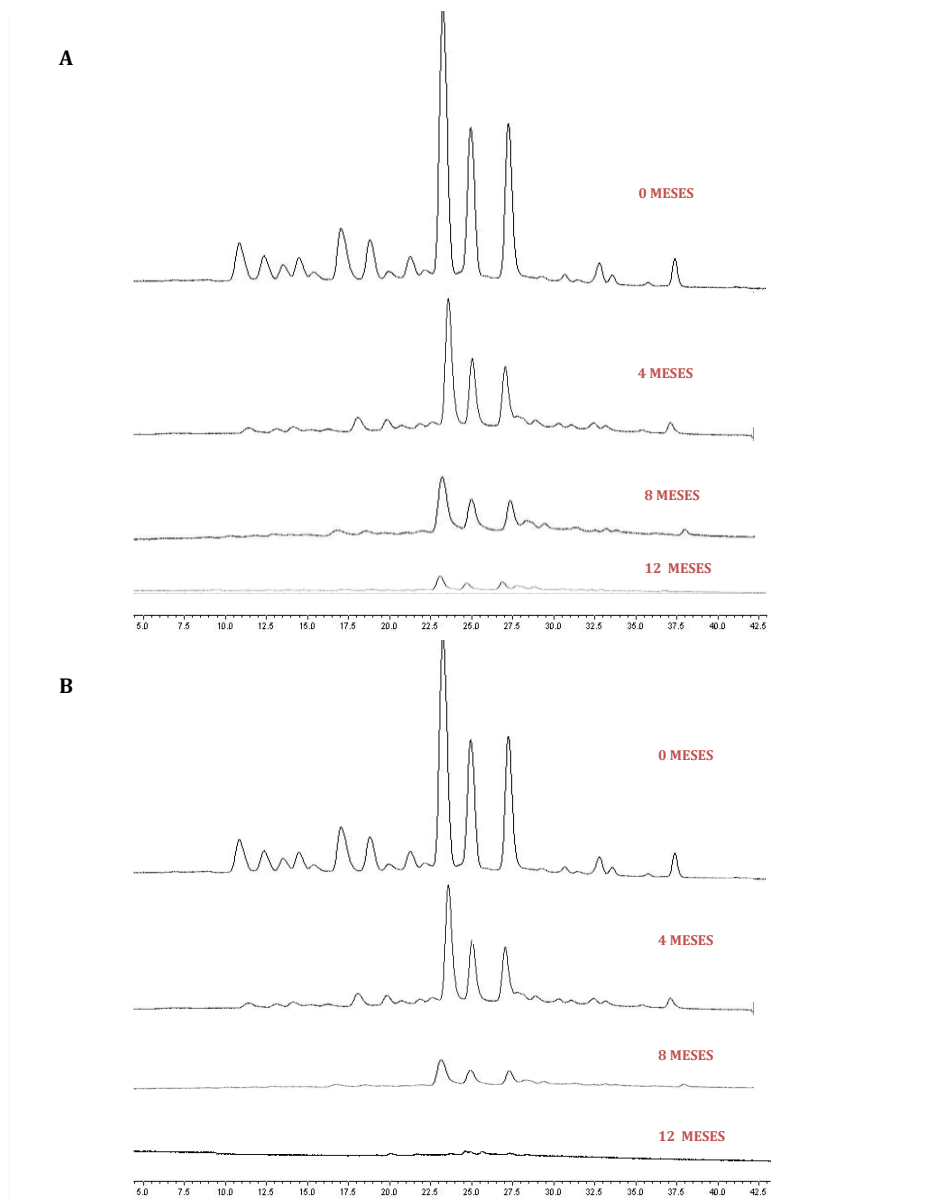


Figura 5.6. Evolución de las antocianinas de un vino de arándano de fermentación parcial (A) y un vino de fermentación total (B) a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento.

La Tabla 5.3 muestra la concentración de antocianinas de los vinos a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento.

Tabla 3. Evolución de la concentración de antocianinas (mg/L) (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los vinos de arándano a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento de en botella.

	V1P21				V1T21			
	0 meses	4 meses	8 meses	12 meses	0 meses	4 meses	8 meses	12 meses
Delfinidín-3- <i>O</i> -galactósido	1.91±0.097	0.788±0.080	0.620±0.002	n.d.	0.671±0.003	0.554±0.007	n.d.	n.d.
Cianidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.758±0.027	0.496±0.039	n.d.	n.d.	0.449±0.007	0.404±0.006	n.d.	n.d.
Petunidín-3- <i>O</i> -galactósido	2.62±0.134	1.25±0.118	1.63±0.003	n.d.	0.797±0.003	0.948±0.019	0.579±0.001	n.d.
Peonidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.786±0.042	n.d.	n.d.	n.d.	0.433±0.002	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -galactósido	10.9±0.522	5.21±0.315	4.26±0.214	1.98±0.040	5.52±0.033	5.45±0.580	1.41±0.007	n.d.
<i>Total galactósidos</i>	17.0±0.683	7.75±0.338	6.50±0.213	1.98±0.040	7.87±0.019	7.35±0.585	1.98±0.008	n.d.
Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	1.57±0.073	0.798±0.079	0.672±0.002	n.d.	0.714±0.005	0.654±0.013	n.d.	n.d.
Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	0.642±0.013	0.496±0.013	n.d.	n.d.	0.414±0.001	0.431±0.006	n.d.	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido	6.62±0.487	3.60±0.011	3.54±0.004	2.31±0.012	3.39±0.008	2.85±0.015	1.33±0.008	n.d.
<i>Total glucósidos</i>	8.83±0.417	4.90±0.079	4.21±0.004	2.31±0.012	4.52±0.008	3.94±0.166	1.33±0.008	n.d.
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinósido	1.21±0.079	0.643±0.005	n.d.	n.d.	0.442±0.002	0.444±0.008	n.d.	n.d.
Cianidín-3- <i>O</i> -arabinósido	2.37±0.120	1.31±0.092	1.83±0.027	n.d.	1.19±0.003	1.17±0.192	n.d.	n.d.
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinósido	1.59±0.093	0.924±0.020	n.d.	n.d.	0.588±0.001	0.540±0.035	n.d.	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinósido	7.36±0.358	3.94±0.019	2.60±0.003	1.78±0.040	3.66±0.002	3.41±0.370	1.02±0.009	n.d.
<i>Total arabinósidos</i>	12.5±0.420	6.82±0.087	4.43±0.029	1.78±0.040	5.88±0.005	5.56±0.585	1.02±0.009	n.d.
Cianidina	0.716±0.018	n.d.	n.d.	n.d.	0.698±0.002	n.d.	n.d.	n.d.
Petunidina	1.18±0.026	n.d.	n.d.	n.d.	0.826±0.002	n.d.	n.d.	n.d.
Peonidina	0.420±0.018	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidina	0.966±0.022	0.751±0.036	0.932±0.015	n.d.	0.580±0.010	0.681±0.048	n.d.	n.d.
<i>Total Agliconas</i>	3.28±0.080	0.751±0.036	0.932±0.015	n.d.	2.10±0.010	0.681±0.048	n.d.	n.d.
Peonidín-3-pentósido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.531±0.002	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Total peonidín-3-pentósido</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.531±0.002	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Total Antocianos</i>	41.6±0.446^a	20.2±0.538^b	16.1±0.241^c	6.07±0.020^d	20.9±0.019^a	17.5±1.34^b	4.33±0.006^c	n.d.

Tabla 3. Continuación

	VIP17					V1T17				
	0 meses	4 meses	8 meses	12 meses	0 meses	4 meses	8 meses	12 meses		
Delfinidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.479±0.019	0.910±0.005	n.d.	n.d.	n.d.	0.520±0.001	0.469±0.013	n.d.		
Cianidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.476±0.001	0.647±0.002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Petunidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.827±0.035	0.831±0.004	1.13±0.008	n.d.	0.667±0.017	0.966±0.057	0.650±0.026	n.d.		
Peonidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.538±0.018	0.943±0.007	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Malvidín-3- <i>O</i> -galactósido	7.11±0.448	4.04±0.102	4.78±0.067	2.84±0.188	5.11±0.274	4.22±0.030	4.02±0.046	n.d.		
Total galactósidos	9.43±0.449	7.37±0.093	5.91±0.074	2.84±0.188	5.78±0.260	5.71±0.087	5.14±0.033	n.d.		
Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	0.383±0.004	0.479±0.003	n.d.	n.d.	0.477±0.003	0.442±0.004	0.533±0.006	n.d.		
Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	0.343±0.006	0.447±0.002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido	3.14±0.142	2.69±0.011	2.61±0.007	2.22±0.034	2.32±0.012	2.22±0.005	1.56±0.011	n.d.		
Total glucósidos	3.87±0.151	3.61±0.013	2.61±0.007	2.22±0.034	2.80±0.013	2.66±0.007	2.09±0.013	n.d.		
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.396±0.002	0.831±0.004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Cianidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.621±0.025	0.734±0.005	0.860±0.004	n.d.	0.831±0.018	0.818±0.079	0.747±0.004	n.d.		
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.611±0.007	0.903±0.004	n.d.	n.d.	0.620±0.012	n.d.	n.d.	n.d.		
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinósido	5.16±0.233	3.84±0.016	3.99±0.017	1.91±0.012	4.10±0.102	2.99±0.450	2.03±0.081	n.d.		
Total arabinósidos	6.79±0.217	6.31±0.019	4.85±0.020	1.91±0.012	5.55±0.108	3.81±0.372	2.78±0.078	n.d.		
Cianidina	0.518±0.002	n.d.	n.d.	n.d.	0.676±0.032	n.d.	n.d.	n.d.		
Petunidina	0.668±0.019	n.d.	n.d.	n.d.	0.713±0.006	n.d.	n.d.	n.d.		
Peonidina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Malvidina	0.668±0.026	0.809±0.010	0.841±0.014	n.d.	0.490±0.019	0.550±0.016	0.553±0.011	n.d.		
Total Agliconas	1.85±0.016	0.809±0.010	0.841±0.014	n.d.	1.88±0.007	0.550±0.016	0.553±0.011	n.d.		
Peonidín-3-pentósido	0.518±0.002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Total peonidín-3-pentósido	0.518±0.002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Total Antocianos	22.5±0.721^a	17.9±0.071^b	14.2±0.043^c	6.97±0.168^d	16.0±0.18^a	12.4±0.446^b	10.6±0.066^c	n.d.		

Tabla 3. Continuación

	V2P21					V2T21				
	0 meses	4 meses	8 meses	12 meses	0 meses	4 meses	8 meses	12 meses	0 meses	12 meses
Delfinidín-3- <i>O</i> -galactósido	1.35±0.038	0.819±0.109	0.518±0.008	n.d.	0.824±0.002	0.686±0.004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cianidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.590±0.039	0.614±0.004	n.d.	n.d.	0.760±0.004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Petunidín-3- <i>O</i> -galactósido	2.35±0.118	1.76±0.170	1.51±0.016	n.d.	2.01±0.011	1.27±0.003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Peonidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.701±0.090	0.890±0.004	0.883±0.012	n.d.	0.987±0.029	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -galactósido	18.9±0.441	11.2±0.917	8.46±0.103	4.48±0.241	12.4±1.37	8.33±0.015	3.25±0.009	n.d.	n.d.	n.d.
Total galactósidos	23.8±0.567	15.3±0.976	11.4±0.079	4.48±0.241	17.0±1.40	10.3±0.011	3.25±0.009	10.3±0.011	3.25±0.009	n.d.
Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	2.04±0.007	0.825±0.096	0.573±0.011	n.d.	0.731±0.020	1.13±0.007	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	0.765±0.009	0.481±0.009	n.d.	n.d.	0.737±0.009	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido	10.6±0.042	6.04±0.448	5.08±0.160	2.70±0.033	6.89±0.079	4.80±0.066	1.90±0.024	n.d.	n.d.	n.d.
Total glucósidos	13.4±0.045	7.35±0.366	5.65±0.151	2.70±0.033	8.36±0.090	5.93±0.059	1.90±0.024	5.93±0.059	1.90±0.024	n.d.
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinósido	0.807±0.067	0.698±0.011	0.471±0.005	n.d.	0.758±0.016	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cianidín-3- <i>O</i> -arabinósido	3.68±0.020	0.618±0.010	1.42±0.016	n.d.	1.61±0.010	1.86±0.005	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinósido	1.66±0.021	1.09±0.124	0.938±0.033	n.d.	1.37±0.028	n.d.	0.779±0.007	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinósido	13.3±0.034	8.06±0.783	4.54±0.039	2.70±0.013	9.82±0.113	6.73±0.005	2.03±0.059	n.d.	n.d.	n.d.
Total arabinósidos	19.5±0.060	10.5±0.908	7.37±0.035	2.70±0.013	13.6±0.120	8.59±0.041	2.81±0.065	8.59±0.041	2.81±0.065	n.d.
Cianidina	1.24±0.030	n.d.	n.d.	n.d.	0.961±0.066	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Petunidina	1.75±0.041	n.d.	n.d.	n.d.	1.31±0.084	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Peonidina	0.548±0.008	n.d.	n.d.	n.d.	0.558±0.012	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidina	1.34±0.031	1.15±0.067	1.12±0.053	n.d.	1.22±0.040	0.941±0.005	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total Agliconas	4.88±0.104	1.15±0.067	1.12±0.053	n.d.	4.05±0.100	0.941±0.005	n.d.	0.941±0.005	n.d.	n.d.
Peonidín-3-pentósido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.731±0.048	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total peonidín-3-pentósido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.731±0.048	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total Antocianos	61.6±0.749^a	34.3±1.64^b	25.5±0.251^c	9.87±0.212^d	43.7±1.36^a	25.7±0.055^b	7.96±0.053^c	25.7±0.055^b	7.96±0.053^c	n.d.

Tabla 3. Continuación

	V2P17				V2T17			
	0 meses	4 meses	8 meses	12 meses	0 meses	4 meses	8 meses	12 meses
Delfinidín-3- <i>O</i> -galactósido	2.61±0.124	1.04±0.002	0.501±0.025	n.d.	1.19±0.066	0.906±0.002	n.d.	n.d.
Cianidín-3- <i>O</i> -galactósido	0.874±0.068	1.06±0.004	0.276±0.000	n.d.	1.17±0.105	0.569±0.004	n.d.	n.d.
Petunidín-3- <i>O</i> -galactósido	2.88±0.035	1.96±0.004	1.24±0.009	n.d.	2.50±1.76	1.40±0.006	n.d.	n.d.
Peonidín-3- <i>O</i> -galactósido	1.00±0.021	1.23±0.006	0.780±0.080	n.d.	1.19±0.074	0.890±0.005	n.d.	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -galactósido	14.1±0.284	9.26±0.038	5.57±0.055	2.86±0.049	11.8±0.380	7.47±0.201	1.67±0.012	n.d.
Total galactósidos	21.5±0.122	14.5±0.049	8.36±0.046	2.86±0.049	17.8±0.790	11.2±0.197	1.67±0.012	n.d.
Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	1.58±0.001	0.819±0.010	0.543±0.013	n.d.	0.989±0.105	0.834±0.003	n.d.	n.d.
Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	0.970±0.014	0.942±0.010	0.563±0.018	n.d.	0.899±0.074	0.643±0.007	n.d.	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido	8.73±0.228	5.82±0.036	3.18±0.035	1.67±0.015	7.05±0.268	4.48±0.033	0.992±0.016	n.d.
Total glucósidos	11.3±0.241	7.58±0.040	4.28±0.008	1.67±0.015	8.94±0.446	5.96±0.040	0.992±0.016	n.d.
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinósido	1.18±0.021	0.777±0.006	0.563±0.002	n.d.	0.873±0.077	0.652±0.003	n.d.	n.d.
Cianidín-3- <i>O</i> -arabinósido	2.86±0.041	1.55±0.003	1.06±0.060	n.d.	1.82±0.086	1.47±0.004	n.d.	n.d.
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinósido	1.61±0.015	1.17±0.017	0.750±0.024	n.d.	1.25±0.016	0.863±0.007	n.d.	n.d.
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinósido	9.10±0.025	4.89±0.157	n.d.	1.30±0.013	7.96±0.225	5.26±0.032	0.927±0.019	n.d.
Total arabinósidos	16.7±3.33	8.39±0.141	2.37±0.083	1.30±0.013	13.3±2.07	8.24±0.039	0.927±0.019	n.d.
Cianidina	0.967±0.050	n.d.	n.d.	n.d.	0.930±0.041	n.d.	n.d.	n.d.
Petunidina	1.02±0.010	n.d.	n.d.	n.d.	1.38±0.036	n.d.	n.d.	n.d.
Peonidina	0.566±0.006	n.d.	n.d.	n.d.	0.619±0.008	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidina	1.15±0.029	1.05±0.005	0.763±0.013	n.d.	1.24±0.051	0.711±0.006	n.d.	n.d.
Total Agliconas	3.70±0.081	1.05±0.005	0.763±0.013	n.d.	4.17±0.017	0.711±0.006	n.d.	n.d.
Peonidín-3-pentósido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.794±0.003	n.d.	n.d.	n.d.
Total peonidín-3-pentósido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.794±0.003	n.d.	n.d.	n.d.
Total Antocianos	51.2±0.266^a	30.3±0.184^b	16.2±0.111^c	5.83±0.072^d	43.6±1.62^a	25.3±0.163^b	3.59±0.043^c	n.d.

La familia de los galactósidos, siempre fue la mayoritaria, seguida por los arabinósidos, siendo el compuesto mayoritario en todos los casos el malvidín-3-galactósido. En cuanto a las concentraciones totales de antocianinas obtenidas de cada vino a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento, se puede observar que se produjo una disminución durante el proceso, encontrando diferencias significativas al aumentar el tiempo de almacenamiento. A los 12 meses de evolución en botella, sólo se pudieron cuantificar algunos antocianos, en los vinos de fermentación parcial de ambas temperaturas como son, los derivados galactósido, arabinósido y glucósido de la malvidina, lo que resulta lógico, ya que fueron los compuestos mayoritarios desde los vinos de 0 meses.

Los derivados galactósidos, presentaron una disminución en los vinos de fermentación parcial entre un 70 y un 88%, mientras que en el caso de los vinos de fermentación total, no se pudieron detectar estos compuestos (Figura 5.7). Los derivados arabinósidos redujeron su concentración entre 72 y 92% entre los 0 y 12 meses de almacenamiento en los vinos de fermentación parcial y desapareciendo totalmente en los vinos de fermentación total. Los vinos obtenidos a 21 °C de fermentación parcial presentaron reducciones muy similares (86 y 86%, para los vinos 1 y 2 respectivamente), encontrando mayores diferencias en los vinos obtenidos a 17°C y con fermentación total (72 y 92% para los vinos 1 y 2, respectivamente). En cuanto a los derivados glucósidos, disminuyeron entre un 42 y un 85% desde los 0 a los 12 meses en los vinos de fermentación parcial, mientras que en los vinos que completaron su fermentación desaparecieron totalmente. En los primeros, la disminución de los antocianos respecto del vino de 0 meses fue de un 74 y un 80% para los vinos 1 y 2 de fermentación parcial de 21°C de proporción 1:1 y 2:1, respectivamente.

En todos los derivados, se comprobó que los vinos 1 y 2 obtenidos a 21 °C y fermentados parcialmente (V1P21 y V2P21), presentaron un comportamiento de disminución de derivados de antocianos similar. Sin embargo, este comportamiento no se encontró en los correspondientes vinos obtenidos a 17°C, donde se vio que siempre los vinos 1 presentaron una disminución de estos compuestos más lenta que los vinos 2, aunque estos últimos presentaran mayor concentración de antocianos que los primeros.

La disminución en las concentraciones de antocianos monómeros durante la estabilización en botella de vinos de uva, ha sido estudiada por numerosos autores (Pérez-Magariño and González San-José, 2004; Alen-Ruiz et al., 2009). Muchos de estos autores han comprobado que la disminución de antocianos monómeros es producida debido a la transformación en oligómeros o polímeros más estables (Monagas et al., 2003a). Estas transformaciones se producen como resultado de reacciones de oxidación, condensación y polimerización (Del Caro et al., 2010), llegándose a medir disminuciones del 72 y 85% en vinos de uva Mencía y Brancellao, respectivamente, tras 12 meses de estabilización en botella (García-Falcón et al., 2007), lo que estaría de acuerdo con el descenso de la concentración de antocianos en los vinos de arándano que se ha explicado anteriormente.

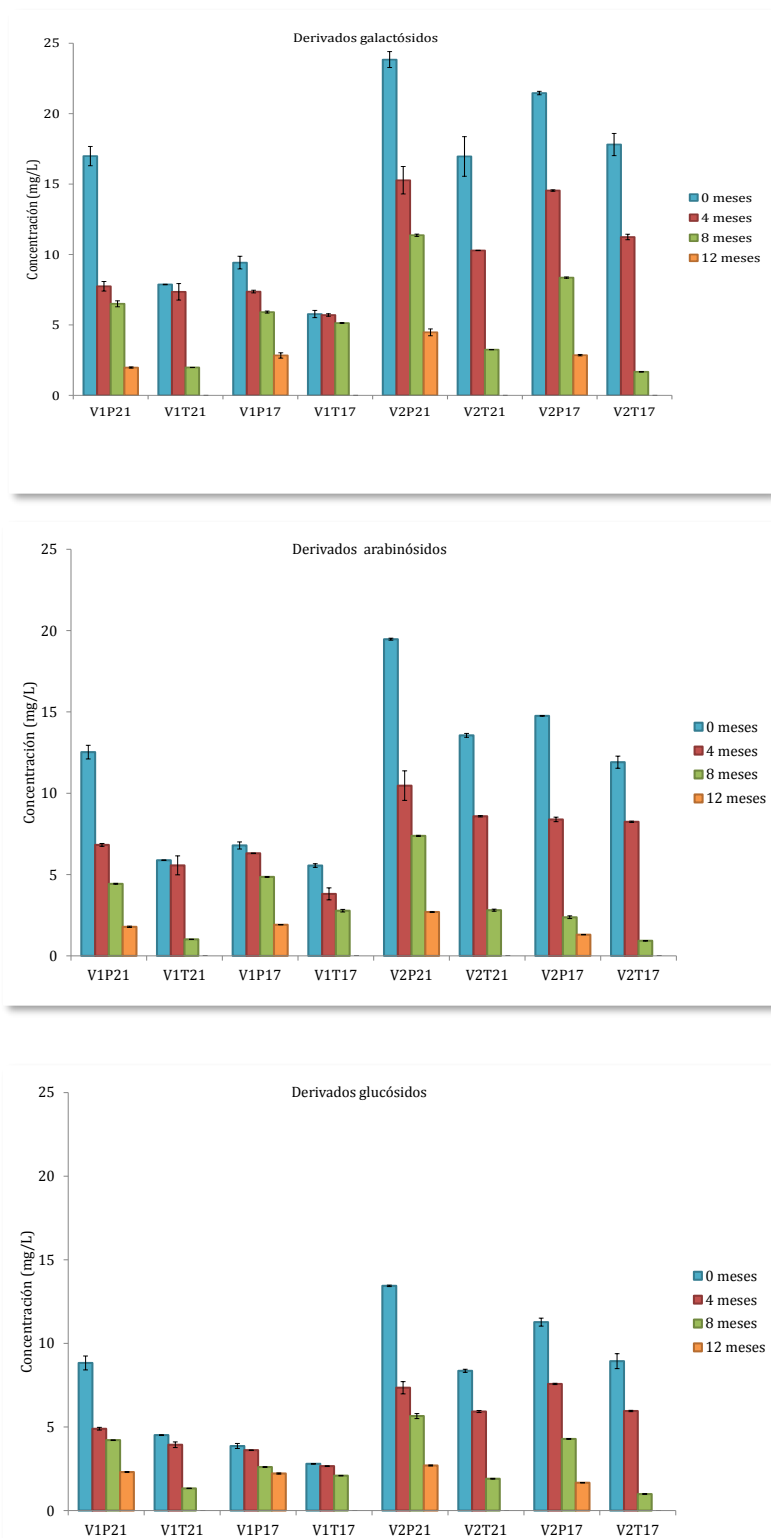


Figura 5.7. Evolución de las familias de antocianinas (media y desviación estándar) de los vinos de arándano a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento.

Aún con la disminución de la concentración de antocianinas constantemente a lo largo del tiempo, los vinos tintos de uva mantienen el color rojo (He et al., 2012), lo mismo que ocurre en este estudio, ya que los vinos elaborados tanto de fermentación total como parcial, presentaron color rojo a los 12 meses aunque las antocianinas monoméricas no pudieran detectarse o se cuantificaran en pequeñas cantidades, como es el caso de los vinos de fermentación parcial (Figura 5.6). Esta disminución de las antocianinas y persistencia del color de los vinos tintos pueden ser debidas a reacciones de mecanismos complejos, como la autoasociación y copigmentación, o las reacciones de formación de pigmentos poliméricos resultantes de antocianos con flavan-3-ols y proantocianidinas; así como la formación de nuevos pigmentos como son las pironoantocianinas y sus derivados más polimerizados, haciendo que cambie el color de rojo-azulado a rojo-anaranjado (Wrolstad et al., 2005; Jackson et al., 2008; Brouillard et al., 2003). Algunos autores han encontrado que el color rojo de los vinos tintos se mantiene con el tiempo debido a la formación de vitisinas A y B, que son pigmentos estables (Marquez et al., 2013). Todo lo anterior podría explicar la persistencia del color rojo de los vinos de arándano obtenidos.

3.4. Evolución de la actividad antioxidante

El test del DPPH es ampliamente utilizado como un método eficiente y simple de evaluación de la actividad antioxidante de vinos tintos (Xanthopoulou et al., 2010; Phino et al., 2012). Los vinos tintos de uva contienen gran cantidad de fenoles que participan en muchas reacciones químicas durante la maduración y el envejecimiento del vino, modificando características del vino, como son el color, el sabor, y la actividad antioxidante (Del Caro et al., 2010; Rivero-Pérez et al., 2008). La actividad antioxidante de los vinos elaborados se vio influenciada por el tiempo de almacenamiento como se puede ver en la Figura 5.8.

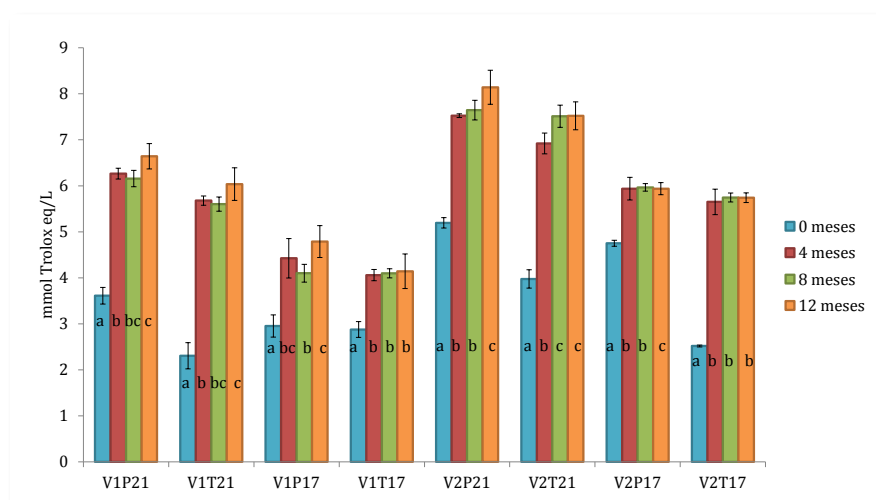


Figura 5.8. Valores de la actividad antioxidante (media, desviación estándar y grupos homogéneos) de los vinos de arándano a los 0, 4, 8 y 12 meses de almacenamiento.

En general la actividad antioxidante incrementó con el tiempo de almacenamiento, siendo los vinos 2 los que presentaron mayores valores de este parámetro. El mayor incremento se produjo en los primeros 4 meses, pudiéndose notar que este incremento fue en algunos casos hasta más del doble de los valores iniciales de actividad antioxidante. Como se puede observar, a partir de los cuatro meses de almacenamiento en botella, la actividad antioxidante de los vinos se mantuvo prácticamente constante en muchos casos, no encontrándose diferencias significativas entre los meses 4, 8 y 12, en muchos de ellos.

Muchos autores afirman que la actividad antioxidante decrece en vinos de uva envejecidos debido a reacciones que hacen que los polifenoles pasen a ser compuestos más polimerizados (Yang et al., 2009). Sin embargo, en la bibliografía, se pueden encontrar controversias en algunos estudios. Pelegrini et al. (2000), afirman que la actividad antioxidante de los vinos jóvenes es mayor que la de los vinos envejecidos. Por otro lado, Larrauri et al. (1999), afirman que los vinos envejecidos presentan mayor actividad antioxidante que los vinos jóvenes, en este caso estaría de acuerdo con los vinos estudiados en este capítulo.

Algunos autores han determinado que un factor que influye en los valores de la actividad antioxidante y la composición fenólica durante el almacenamiento es el recipiente donde se realice este (Ho et al., 2001; Del Caro et al., 2010; Gómez-Plaza et al., 2000; Rivero-Pérez et al., 2008; Pinho et al., 2012). Por un lado, Del Caro et al. (2010) en vinos de uva, no observaron cambios significativos en los valores de actividad antioxidante (por el método del DPPH) en vinos almacenados en botella durante 330 días. Estos autores justifican este hecho por el ambiente reductor de la botella, que podría hacer que las reacciones de condensación, oxidación y polimerización se produjeran en menor proporción que en vinos que se almacenaron en otro tipo de recipiente. Por otro lado, Pinho et al. (2012), afirmaron que los vinos que se envejecieron en botella presentaron mayor actividad antioxidante que los vinos almacenados en barricas (en contacto con el oxígeno), debido también al ambiente reductor de la botella. Por tanto, si el recipiente de almacenamiento es un factor determinante para la calidad, composición fenólica y actividad antioxidante de un vino, sería conveniente el estudio del envejecimiento de los vinos de arándano en estudio en otros recipientes, como podrían ser, acero inoxidable o barricas.

4. Conclusiones/Conclusions

Conclusiones

1. Todos los vinos presentaron valores de pH en el mismo rango que lo hacen los vinos de uva, por lo que el almacenamiento en las condiciones estudiadas es adecuado para la conservación de estos vinos.
2. Las absorbancias a 420 y 520 nm presentaron un comportamiento similar durante todo el envejecimiento. En los 4 primeros meses, los tonos rojos y los pardos experimentaron el cambio más importante en el color. A partir de los 4 meses, las dos absorbancias se mostraron prácticamente estables. La absorbancia a 620 nm presentó en general valores muy bajos, mostrando un ligero aumento a los 8 meses, y disminuyendo de nuevo a los 12 meses.

3. Los antocianos monómeros disminuyeron durante el proceso de envejecimiento en botella. Sólo los derivados galactósido, arabinósido y glucósido de la malvidina se cuantificaron en los vinos que habían sido fermentados parcialmente tras un año de almacenamiento, no cuantificándose ningún monómero en los vinos que completaron su fermentación.

4. La actividad antioxidante incrementó con el tiempo de almacenamiento en botella, hasta llegar a los 4 meses. Este incremento fue casi el doble en algunos casos. En general, a partir de los 4 meses, la actividad antioxidante se mantuvo prácticamente constante.

Conclusions

1. All wines presented pH values in the same range as grape wines, so storage under the studied conditions is adequate for the conservation of these wines.

2. Absorbances at 420 and 520 nm showed a similar behavior throughout the aging process. In the first 4 months, the red and brown hues presented the most significant change in color. After 4 months, the two absorbances were practically stable. Absorbance at 620 nm generally showed very low values, showing a slight increase at 8 months, and decreasing again at 12 months.

3. Anthocyanin monomers decreased during the bottle aging process. Only the galactoside, arabinoside and glucoside derivatives of malvidin were quantified in the wines that had been partially fermented after one year of storage, with no monomers quantifying in the wines that completed their fermentation.

4. The antioxidant activity increased with the storage time in bottle, during the first 4 months. This increase was almost double in some cases. In general, after 4 months, the antioxidant activity remained practically constant.

VALORIZATION OF BILBERRY JUICE BY- PRODUCTS

1. Introduction

The optimization of food processes based on the reduction of waste has become a standard among developed countries. The directive of the European Union 2008/98 / EC says that "the prevention of waste should be the first priority of waste management and that the reuse of waste and recycled material should be preferred for the recovery of energy from those waste" (European Parliament and of the Council on Waste and Repealing Certain Directives., 2008; Pedroza et al., 2011). Currently, the valorization of waste from fruit processing industries has increased considerably because of the interest in antioxidant extraction from agricultural and industrial by-products (Tabaraki et al., 2012).

These residues are research-focused because they contain large amounts of bioactive compounds such as phenolic compounds, and they are beneficial to human health (Müller et al., 2012). Some of the properties that they provide are the inhibition of tumor cell growth, the induction of apoptosis; moreover they have anticarcinogenic properties.

Bilberries are fruits that are processed to obtain syrups, juices, ice cream, and other food products. As a result, the bilberry juice waste contains large concentrations of anthocyanins and other phenolic compounds. This residue can be a source of natural colorants and nutraceuticals (Lee et al., 2004) or can be used as a source of enrichment for the same processed product or others that require it (Al Bittar et al., 2013).



Figure 6.1. Food by-products.

In recent years the development of "green" techniques for obtaining natural extracts has been promoted due to their increasing demand (Jacotet-Navarro et al., 2015). The processes of "green" extraction have also been developed to avoid the problems encountered when conventional methods are used (Pradal et al., 2016). The "green" technique can be defined as follows: "Green extraction is based on the discovery and design of extraction processes which will reduce energy consumption, allow the use of alternative solvents and renewable natural products, and ensure a safe and high quality extract/product" (Chemat et al., 2015).

For this reason, ultrasound assisted extraction (UAE) is considered as an "environmentally friendly" or "Green technique" compared to classical maceration (Chemat et al., 2015; Rombaut et al., 2014; Tiwari et al., 2015) because it consumes less fossil energy and also allows the reduction of solvent use, resulting in higher yields in shorter extraction time (Petigny et al., 2012; Carrera et al.,

2012). In addition, this technique has greater simplicity when it comes to handling compared to conventional methods (Tabakari et al., 2012).

UAE technology is used to extract bioactive compounds located in the vacuoles of plant cells. This technique affects the cell permeability by different mechanisms, and enhances the mass transfer phenomena (Barba et al, 2015). When the negative pressure caused by an ultrasonic wave crossing a liquid is large enough, the distance between the molecules of the liquid exceeds the minimum molecular distance required to hold the liquid intact, and then the liquid breaks down and voids are created (Mason, 2000). As a result of this, cavitation bubbles are generated (Figure 6.2b). These bubbles generate a micro-jet directed toward the surface (Figure 6.2c) and abrasion of the surface, breaking of the cell wall, and the release of soluble material in the surrounding medium (Figure 6.2d). The collapse of the bubbles created by acoustic cavitation can be considered as a microreactor in which very high temperatures and pressures higher than one thousand atmospheres are created. These changes create hotspots that are able to dramatically accelerate the chemical reactivity and the turbulence into the medium, resulting in cell damages of the plant material in suspension and facilitating the release of bio-components (Chemat and Khan, 2011).

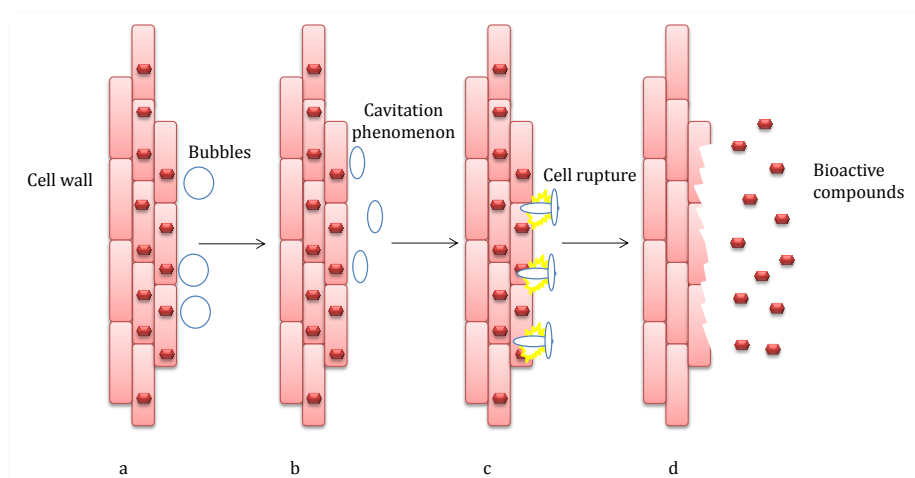


Figure 6.2. Ultrasound effect on berry by-products.

In the process of UAE, high frequency ultrasound additionally ruptures the surface of the berries, causing even more leakage and loss of pigments (Mason, 2000) and the cavitation phenomena is able to cause an increase in the reactivity of the present compounds. It may results in changes of chemical structures (Chemat and Khan, 2011) and due to its high reactivity, the formation of colorless or brown compounds (Stojanovic et al., 2007).

The aim of this work was to evaluate the improvement of UAE combined with stirring versus conventional maceration on the anthocyanins and flavonol profile, as well as on antioxidant capacity and color parameters from freeze-dried bilberry juice by-products using water as a green extraction solvent.

2. Experimental material

An amount of 2700 g of frozen wild bilberries was bought at a local supermarket in Avignon (Southern France) in 2015. The bilberries were pressed in an electric press Hurom HU-100 (Korea), obtaining 2266 g of juice and 434 g of press cake. The press cake was lyophilized and frozen at $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ to stabilize the residue over time.



Figure 6.3. Bilberry juice (right) and obtained waste (left).

The lyophilized press cake was subjected to different extraction processes, a conventional maceration by stirring (300 rpm ; 0 W cm^{-2}) used as the control, and ultrasound probe using four different ultrasonic intensities (UI) (4.4 , 9.4 , 13.4 and 16.7 W cm^{-2}) combined with conventional maceration (300 rpm).

In the case of conventional maceration, five grams of the lyophilized bilberry residue was placed in double jacket reactor with 1 L of solvent (distilled water). This reactor was refrigerated during the process with water recirculation ($7\text{ }^{\circ}\text{C}$) to prevent overheating. The mixture was submitted to stirring (300 rpm) with a magnetic stirrer (IKA RCT classic, Germany). Conventional maceration was carried out as a control to evaluate the improvement of ultrasound assisted extraction.

In the case of ultrasound assisted extraction, five grams of lyophilized bilberry residue was placed in a double jacket reactor with 1 L of solvent (distilled water). This reactor was refrigerated during the process with water recirculation ($7\text{ }^{\circ}\text{C}$). The mixture was submitted to an ultrasonic homogenizer (1 kW , UIP 1000 hdT, Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany) and stirred (300 rpm) with a magnetic stirrer (IKA RCT classic, Germany). Ultrasound was applied to the system using the sonotrode immersed in the solvent approximately 6 cm . Temperature inside the reactor was measured with an external sensor and controlled by a cryostat (Ministat 125, Huber, Germany). Total time extraction was 60 min and the temperature inside the reactor was between 20 and $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Figure 6.4 shows UAE equipment used.

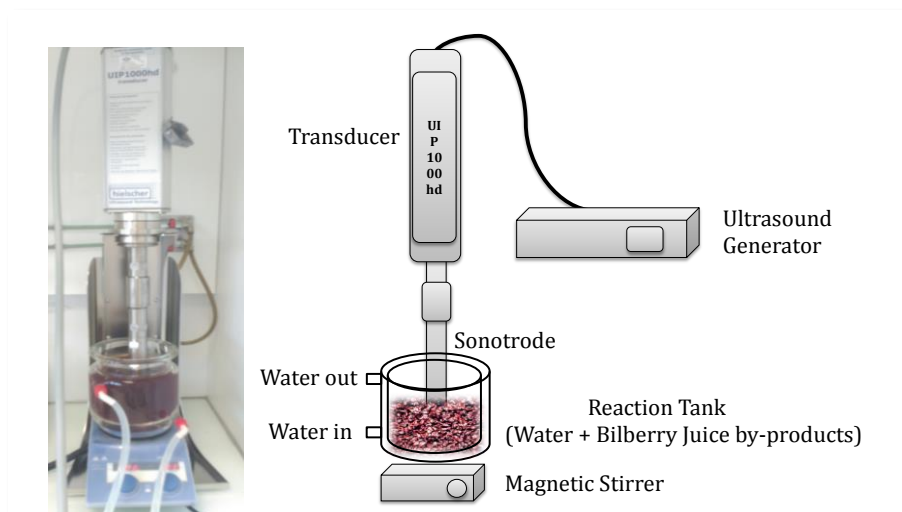


Figure 6.4. Ultrasound assisted extraction equipment.

The sample collection was carried out at different times in all extraction processes (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 and 60 min). In each extraction process, the extracts collected at each time were filtered through 0.45 μm nylon filters, and frozen before analysis.



Figure 6.5. Bilberries extract obtained by UAE.

Sample collection for total phenolic compounds and kinetic extraction was carried out at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 y 60 minutes. In the case of anthocyanins and flavonols compounds, color and antioxidant activity, the simple collection was at 60 minutes. Figure 6.6 shows the Scheme of the procedure followed for the extraction process.

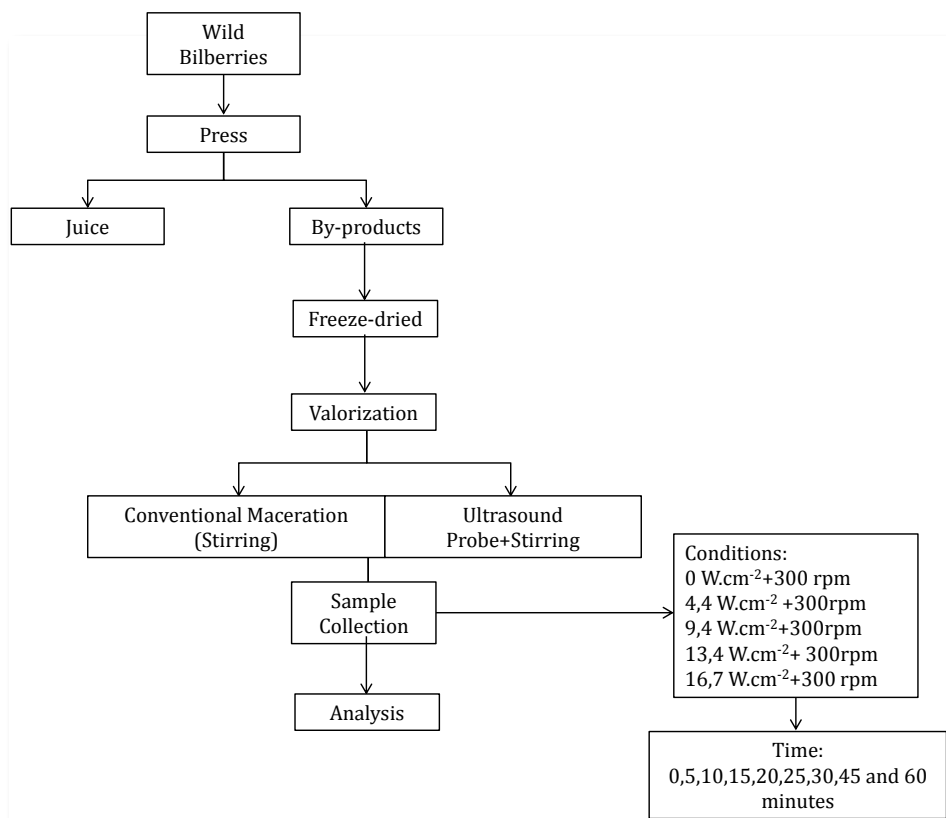


Figure 6.6. Scheme of the procedure followed for the extraction process.

3. Results and discussion

3.1. Dry matter extraction yield

The dry matter content gives an idea of the soluble matter that is transferred from the waste to the solvent used (Petigny et al., 2013). In the case of conventional maceration, the solvent remained in the perimeter of the residue and it was only capable of extracting what was dissolved in the medium. However, in the case of ultrasound-assisted extraction, the extraction yield of soluble matter was greater, thanks to the help of the cavitation phenomenon that occurred during sonication (Jacotet-Navarro et al., 2015). This phenomenon led to the breaking of the pair, as well as the rupture of the walls of plant cells, facilitating the release of the compounds towards the solvent (Vinatoru, 2001), increasing the yield of dry matter extraction yield and therefore the amount of solubilized matter (Figure 6.2). The kinetics of extraction with distilled water using conventional maceration and UAE of different ultrasonic intensities is presented in Figure 6.7.

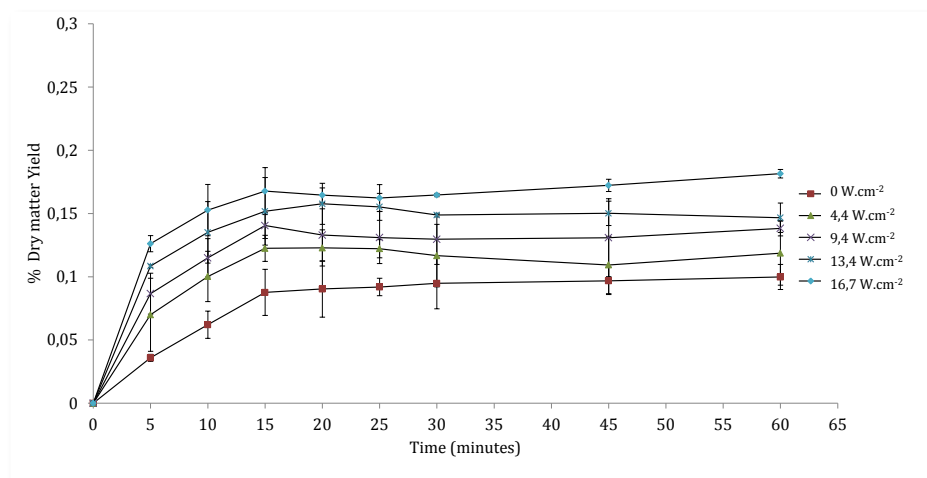


Figure 6.7. Evolution of dry matter extraction yield (%) (mean and standard deviation) as a function of extraction time and ultrasonic intensity.

As it can be seen, the dry matter extraction yield was higher when the UI increased. It might be due to the cavitation phenomena, which produces greater formation of bubbles and an increase of pressure in the aqueous medium, when the intensity of ultrasound is higher. The difference of extraction percentage between the extraction performed by conventional maceration and the extraction combined with the highest UI (16.7 W cm^{-2}) was 81.9%. It can also be noted that the extraction yield by conventional maceration at 60 min was reached approximately between 5 and 7 min using the ultrasound assisted extraction. Dry matter extraction yield became constant after 15–20 min in all cases, so increasing the extraction time beyond this value would not be necessary.

Other authors have found that with the use of the ultrasound probe the extraction maximum is reached much faster than with conventional maceration. For example, Petigny et al., (2013) checked with boldo leaf residues, that the amount of soluble matter that was reached with conventional maceration at 120 minutes,

could be obtained at 30 minutes using UAE, arriving to consider that the reached thing by UAE would be unattainable by conventional maceration.

3.2. Total phenolic compounds

As was found in the first chapter of this study, numerous studies have shown that bilberries are fruit that have a large amount of phenolic compounds (Moyer et al., 2002; Wang et al., 2012). As already mentioned and verified, the press residue of wines and blueberries juices still contained a high concentration of these compounds (He et al., 2016). Figure 6.8 shows total phenolic compounds values as a function of extraction time and ultrasonic intensity.

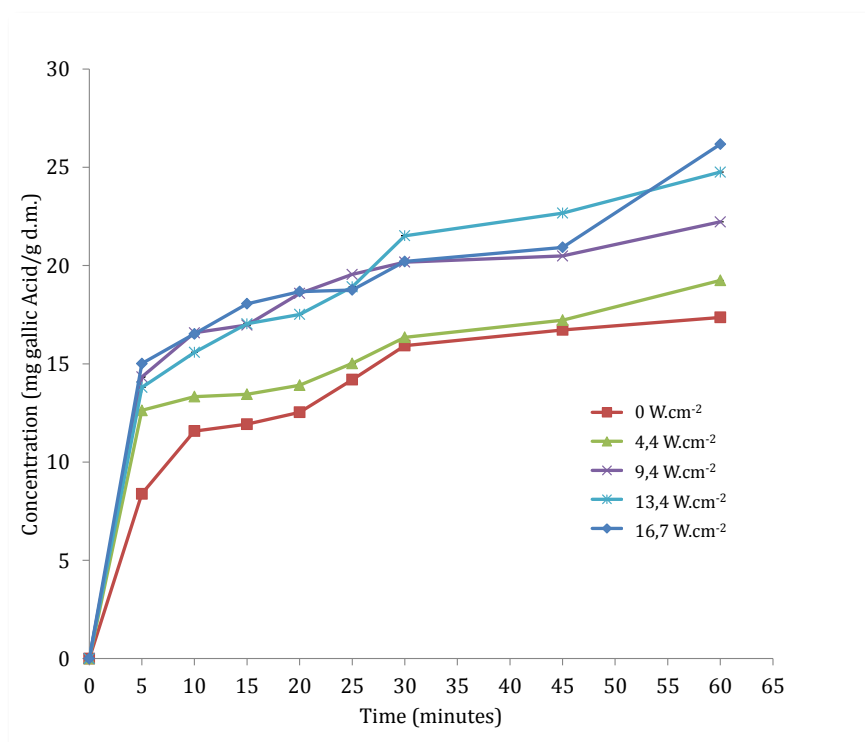


Figure 6.8. Evolution of total phenolic content (mean and standard deviation) as a function of extraction time and ultrasonic intensity.

As it can be seen, in all cases the total polyphenolic content increased with the extraction time, and with the increased of UI, reaching the highest values with UAE at 9.4, 13.4 and 16.7 Wcm⁻². However, UAE at 4.4 W cm⁻² resulted in much lower phenolic compound concentration compared to other UI. The lowest phenolic compound extraction was obtained by conventional maceration. Indeed, the highest concentration of these compounds achieved by conventional maceration at 60 min was reached by UAE at approximately 10 min of extraction with intensities higher than 4.4 W cm⁻². The enrichment in phenolic compounds assessed by UAE compared to conventional maceration was 10.8, 28.0, 42.6, and 50.8% for the intensities of 4.4, 9.4, 13.4 y 16.7 W cm⁻², respectively. Other authors have demonstrated that the UAE improves the extraction yield of phenolic

compounds using ethanol (70% v/v) and hydrochloric acid (0.01%, v/v) (He et al., 2016); water (Galvan d'Alessandro et al., 2012); as an extraction solvents. In particular, these authors found that 15 min of ultrasound obtained better extraction yields in phenolic compounds compared to 60 min of conventional maceration.

3.3. Anthocyanins

As was shown in the first chapter of this study, some authors such as Pereira Kechinski et al., (2010), found that these fruits contain a lot of anthocyanin compounds, which are related to the great antioxidant activity that these fruits present. He et al. (2016), found six anthocyanins in the optimization of the recovery of rabbiteye blueberry residues.

In this study, 21 anthocyanins were identified and quantified both by conventional maceration and by UAE. Table 6.1 shows the concentration of anthocyanins identified and quantified in the extracts obtained by the different extraction processes.

Table 1. Anthocyanin concentration (mg/ 100 g d.m.) (mean, standard deviation and homogeneous groups) in the 60 min-extraction extracts according to ultrasonic intensity.

UI (W.cm ⁻²)	0	4.4	9.4	13.4	16.7
Dp-glt	34.8±1.54 ^a	4.87±0.867 ^b	8.81±1.52 ^c	11.9±0.122 ^d	15.1±0.550 ^e
Cn-glt	70.6±1.41 ^a	37.3±0.104 ^b	42.0±1.91 ^c	52.9±0.639 ^d	57.9±1.40 ^e
Pt-glt	23.6±0.820 ^a	5.18±0.658 ^b	7.64±1.45 ^c	10.2±0.064 ^d	11.6±0.147 ^e
Pn-glt	11.1±0.299 ^a	1.92±0.907 ^b	4.01±0.515 ^c	2.98±1.06 ^d	6.35±0.069 ^e
Mv-glt	67.1±0.932 ^a	50.4±1.42 ^b	57.1±1.11 ^c	65.9±0.046 ^a	62.8±0.731 ^c
Total glt	207±3.53^a	99.7±0.693^b	120±4.60^d	144±1.12^c	154±2.05^e
Dp-glc	37.2±1.64 ^a	4.51±0.886 ^b	8.75±1.47 ^c	11.4±0.125 ^d	13.7±0.446 ^e
Cn-glc	76.8±1.47 ^a	47.4±0.252 ^b	55.9±2.47 ^c	69.2±0.352 ^d	65.6±1.01 ^e
Cn-glc	44.9±1.54 ^a	9.91±1.51 ^b	14.7±2.01 ^c	19.7±0.436 ^d	20.7±0.100 ^d
Pn-glc	44.2±0.603 ^a	32.4±1.03 ^b	37.1±0.566 ^c	42.9±0.009 ^d	41.2±0.560 ^e
Mv-glc	123±0.883 ^a	94.5±2.31 ^b	106±1.76 ^c	122±0.445 ^a	117±1.12 ^d
Total glc	326±4.34^a	189±0.848^b	223±5.85^c	265±0.234^d	259±2.29^d
Dp-arb	19.2±0.974 ^a	n.d.	5.08±1.18 ^b	7.42±0.808 ^c	8.61±0.253 ^d
Cn-arb	40.8±0.961 ^a	23.2±0.382 ^b	28.1±1.67 ^c	36.0±0.255 ^d	36.6±0.730 ^d
Pt-arb	12.1±0.165 ^a	8.15±0.562 ^b	9.36±0.227 ^d	8.73±1.37 ^{bd}	11.6±0.088 ^c
Pn-arb	4.82±0.040 ^a	3.68±0.014 ^b	4.44±0.156 ^c	5.26±0.196 ^d	4.92±0.181 ^a
Mv-arb	30.0±0.217 ^a	23.1±0.679 ^b	26.7±0.466 ^c	30.7±0.045 ^d	29.5±0.369 ^e
Total arb	107.0±1.67^a	58.1±0.362^b	73.7±2.62^c	88.2±0.049^d	91.2±1.15^e
Dp-acglt	3.20±0.084 ^a	1.94±0.032 ^b	2.32±0.169 ^c	2.53±0.038 ^d	2.37±0.039 ^c
Cn-acglt	1.63±0.001 ^a	1.16±0.032 ^b	1.34±0.079 ^c	1.58±0.015 ^a	1.45±0.036 ^d
Pt-acglt	3.79±0.141 ^a	0.589±0.088 ^b	0.797±0.143 ^b	1.05±0.009 ^c	1.12±0.007 ^c
Pn-acglt	7.02±0.058 ^a	5.02±0.219 ^b	5.81±0.180 ^c	6.58±0.028 ^d	6.06±0.064 ^e
Mv-acglt	21.4±0.367 ^a	15.5±0.426 ^b	17±0.594 ^c	18.5±0.059 ^d	16.8±0.121 ^c
Total acglt	37.1±0.459^a	24.2±0.349^b	27.2±0.823^c	30.2±0.009^d	27.8±0.188^e
Cn-acglc	3.37±0.026 ^a	2.55±0.114 ^b	2.92±0.120 ^c	3.01±0.035 ^c	2.73±0.023 ^d
Total	680±10.0^a	373±0.999^b	446±0.815^c	530±14.0^d	534±5.70^d

Dp-glt: Delphinidin-3-galactoside; Cn-glt :Cyanidin-3-galactoside; Pt-glt: Petunidin-3-galactoside; Pn-glt: Peonidin-3-galactoside; Mv-glt: Malvidin-3-galactoside; Dp-glc: Delphinidin-3-glucoside; Cn-glc: Cyanidin-3-glucoside; Pt-glc: Petunidin-3-glucoside; Pn-glc: Peonidin-3-glucoside; Mv-glc: Malvidin-3-glucoside; Mv-glc: Malvidin-3-glucoside; Dp-arb: Delphinidin-3-arabinoside; Cn-arb: Cyanidin-3-arabinoside; Pt-arb: Petunidin-3-arabinoside; Pn-arb: Peonidin-3-arabinoside; Mv-arb: Malvidin-3-arabinoside; Dp-acglt: Delphinidin-3-(6-acetoyle)-galactoside; Cn-acglt: Cyanidin-3-(6-acetoyle)-galactoside; Pt-acglt: Petunidin-3-(6-acetoyle)-galactoside; Pn-acglt: Peonidin-3-(6-acetoyle)-galactoside; Mv-acglt: Malvidin-3-(6-acetoyle)-galactoside; Cn-acglc: Cyanidin-3-(6-acetoyle)-glucoside. n.d.: not detected. Values in the same row with different superscript letters are significantly different. p = 0.05.

Regarding the different families of anthocyanins (Table 6.1), the glucosides, galactosides, arabinosides and acetylglactosides derivatives of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin and malvidin were identified and quantified, in addition an acetylglucoside of cyanidin. The major family recovered by conventional maceration and UAE was the glucoside derivatives, followed by

galactosides, arabinosides, acetylgalactosides and in a lower proportion the family of acetylglucosides.

In all extracts obtained, the major anthocyanin recovered was malvidin-3-glucoside. This compound represented 18.6% of the total anthocyanins compounds in conventional maceration, being the percentage using UAE between 22–26%. No significant differences in total anthocyanins recovered with UAE at 13.4 and 16.7 W cm⁻² were found. Figure 6.9 shows the anthocyanin concentration of the extracts at 60 min according to ultrasonic intensity.

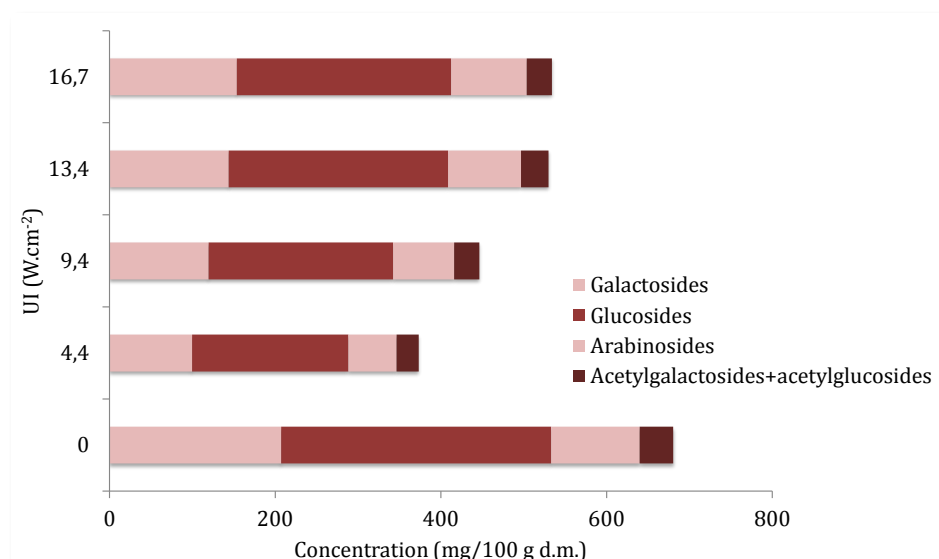


Figure 6.9. Anthocyanin concentration (mean and standard deviation) of the extracts at 60 min according to ultrasonic intensity.

As it can be shown in Table 6.1 and Figure 6.9, it can be verified that anthocyanins decreased after 60 min of sonication whatever UI. The decrease was higher in the extracts from the process at 4.4 W*cm⁻² of UI. The anthocyanin concentration was reduced 45.1, 34.4, 22.1 and 21.5% compared with conventional maceration, for the intensities 4.4, 9.4, 13.4 y 16.7%, respectively. Therefore, the extracts obtained after 60 min with ultrasound had lower concentrations of anthocyanin than the extracts obtained only with conventional maceration.

Other authors have proven that ultrasound induced to anthocyanin degradation in blueberry samples (Stojanovic and Silva, 2007). They found in rabbiteye blueberry samples further anthocyanins degradation when an ultrasound technique combined with osmotic dehydration was applied compared to samples treated only with osmotic dehydration. Other authors attested to the degradation of anthocyanin compounds in strawberry juice sonicated (Tiwari et al, 2008). Some authors observed a browning of apple and cranberry juices caused by the loss of anthocyanins using an ultrasound probe (Caminiti et al, 2011).

Anthocyanins are very susceptible compounds to undergo chemical changes, so during the processing of bilberries, they may be affected, which would justify the results obtained in this study. It has been known that ultrasound, due to its

cavitation phenomenon, can break the surface of fruits to facilitate the release of compounds to the environment, causing pigment losses (Stojanovic et al., 2007). The collapse of the bubbles created by ultrasound is able to cause changes of temperature and pressure in the medium, increasing the reactivity of the present compounds. It results in changes of chemical structures (Pingret et al., 2012) and due to its high reactivity, the formation of colorless or brown compounds (Martynenko and Chen, 2016). The process of sonication can lead to the formation of free radicals that can increase the polymerization/depolymerization reactions (Floros and Liang, 1994) because these radicals in liquid medium and OH (hydroxyl) and H (hydrogen) molecules can accumulate on the surface of the cavitation bubble resulting in degradation products (Pingret et al, 2013), as well as other reactions such as oxidation (Portenlänger and Heusinger, 1992). Moreover, free radicals can participate in the degradation of anthocyanins because they may open the ring structure of anthocyanins obtaining chalcones, which are colorless compounds (Sadilova et al, 2007).

3.4. Flavonols

Flavonols were other phenolic compounds determined in the extracts. Häkkinen et al. (1999) studied different varieties of blueberries identifying and quantifying these compounds in high concentrations. Flavonols and other flavonoids are commonly quantified as the aglycone after acid or enzyme hydrolysis to remove sugar residue. All flavonols were quantified as quercetin.

Table 6.2 shows the concentration of flavonols in the different extracts obtained after 60 min of extraction. No significant differences between conventional maceration and UAE at 4.4 W cm^{-2} were observed. UAE at 16.7 W cm^{-2} presented no significant differences with UAE at 4.4 and 9.4 W cm^{-2} . UAE at 13.4 W cm^{-2} was significantly different from other ultrasonic conditions. In this sense, it could be possible that at higher ultrasound intensity than 13.4 W cm^{-2} , flavonol compounds may degrade or they could react with others compounds what would result in a decrease of these compounds.

Table 6.2. Flavonols concentration (mean and standard deviation) in the 60 min-extraction extracts according to ultrasonic intensity.

UI (W.cm^{-2})	g quercetin/100 g d.m.
0	1.22 ± 0.140^a
4.4	1.31 ± 0.078^{ab}
9.4	1.39 ± 0.268^c
13.4	1.57 ± 0.037^d
16.7	1.40 ± 0.062^{bc}

3.5. Color

The phenolic compounds present in fruits and residues after the processing thereof, are mostly responsible for the color of the final products. Therefore, the measurement of color can give an idea of the content of these compounds, since for example, flavonols provide a yellow color, and anthocyanins provide a red color. The absorbance at 420 nm can be considered as an index of browning of the samples and the absorbance at 520 nm as an index of the red color (Marquez et al., 2014). Figure 6.10 shows the absorbances at 420 and 520 nm measured for the different extracts.

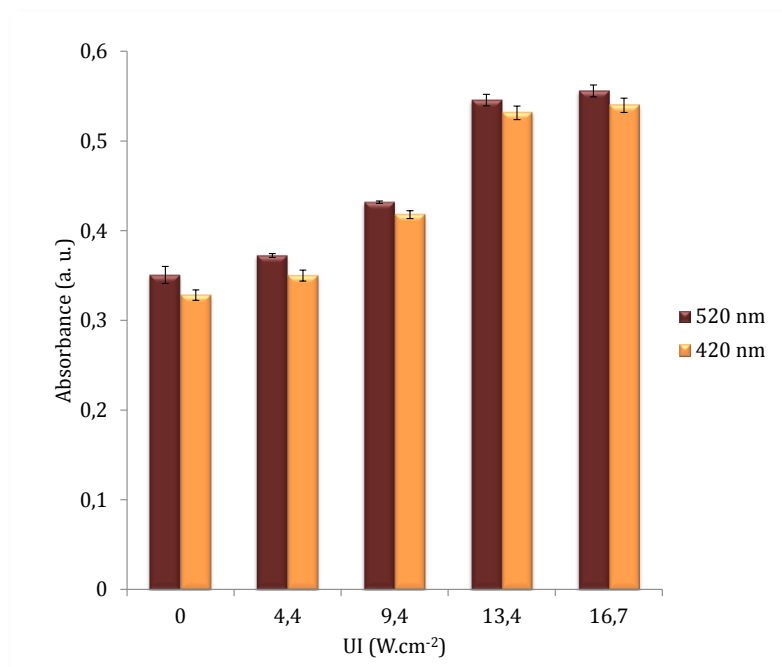


Figure 6.10. Absorbances at 420 and 520 nm (mean and standard deviation) of the extracts at 60 min according to ultrasonic intensity.

All the extracts obtained by UAE showed higher absorbances 520 and 420 nm than those obtained by stirring. The values of both absorbances increased proportionally to ultrasonic intensity, indicating that the contribution of brown and red compounds increased. Significant differences were found between all absorbances values except between 13.4 and 16.7 W cm⁻².

The hue can be defined as the absorbance ratio (A_{420}/A_{520}). Thus, all the extracts obtained by UAE at different ultrasonic intensities and by conventional maceration showed hue values below 1, so extracts contained a higher amount of red than yellow compounds. By increasing the intensity of ultrasound, hue values were getting closer to 1, showing that more brown compounds were extracted.

Mainly, red color is provided by monomeric anthocyanins. So, the decrease of these compounds and the increase of red color respect to the values obtained from conventional maceration, could be due to the extraction of other compounds that provide red color to the formation.

The reaction between anthocyanins and other compounds may result in compounds that provide the red color. For example, anthocyanins may be combined with flavonols by the copigmentation process (phenomenon whereby a pigment and other compounds interact, resulting in an increase in the color intensity) (Boulton, 2001). In this way, anthocyanins can form charge transfer complexes with flavonols, where a weak bond is formed and the electronic density is displaced from the copigment rich in electrons to the flavylum ion; obtaining a flavylum form stabilization and red color increase. In addition, anthocyanins can react with other compounds resulting in polymers that contribute to red color.

On the other hand, the increase in absorbance at 420 nm with the increase of ultrasonic intensity may be due to polymerization and/or browning reactions such as enzymatic and non-enzymatic oxidation reactions of phenolic compounds present in the medium which provide a browning (Martynenko et al., 2016) or maybe, it is possible that more brown compounds were extracted; or it could be due to the combination of both processes.

In addition to the previous absorbances, the coordinates of the Cielab space were measured. The Cielab space can be represented in 3D, taking into account L^* , a^* and b^* or in 2D, using only a^* and b^* , as it is shown in Figure 6.11.

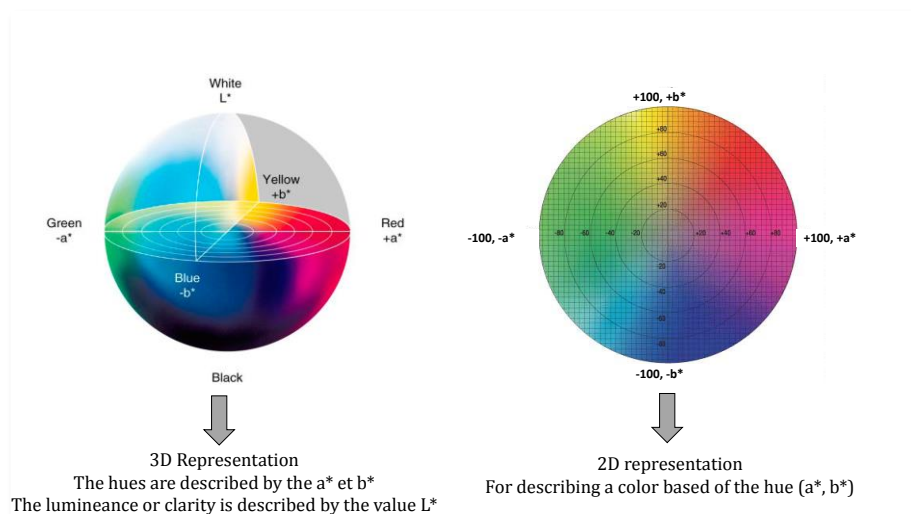


Figure 6.11. Cielab color space representation.

In this way, if the part of the plane formed by the coordinates a^* and b^* in the positive sense of the Cielab space is represented in 2D (Figure 6.11), it can be seen that all the extracts presented values of these coordinates very close to each other, being the two extracts obtained with the highest intensities of ultrasound the most different. These results would be in accordance with the absorbance values at 420 and 520 nm, obtained previously.

The *Lab* parameters of extracts subjected to conventional maceration and ultrasound after 60 min of process were measured (Figure 6.12). Conventional maceration and extracts obtained by UAE at 4.4 W cm^{-2} showed similar *Lab*

values. By increasing the ultrasonic intensity, the values of a^* and b^* were increased, thus the extracts obtained were redder and more yellow. The extracts obtained at higher intensity of ultrasound presented lower values of L , therefore they were darker.

$W.cm^{-2}$	L	a	b	A_{420}	A_{520}
0	78.2 ± 0.870^a	22.4 ± 0.385^a	9.46 ± 1.52^a	0.328 ± 0.008^a	0.351 ± 0.013^a
4.4	76.4 ± 0.730^b	23.6 ± 1.29^{ab}	10.0 ± 0.155^a	0.350 ± 0.009^b	0.372 ± 0.003^b
9.4	75.5 ± 0.430^b	24.2 ± 0.661^b	13.1 ± 0.205^b	0.418 ± 0.006^c	0.432 ± 0.002^c
13.4	70.7 ± 0.305^c	29.3 ± 0.265^c	15.8 ± 0.315^c	0.531 ± 0.011^d	0.546 ± 0.009^d
16.7	70.9 ± 1.00^c	29.7 ± 0.060^c	16.6 ± 0.405^c	0.540 ± 0.011^d	0.556 ± 0.009^d



0 $W.cm^{-2}$ 4.4 $W.cm^{-2}$ 9.4 $W.cm^{-2}$ 13.4 $W.cm^{-2}$ 16.7 $W.cm^{-2}$

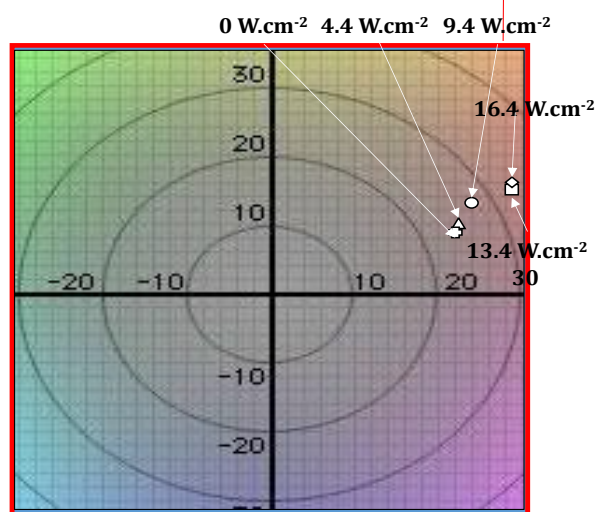
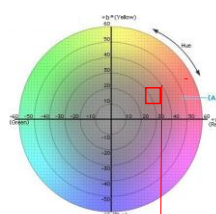


Figure 6.12. Lab parameters, absorbances at 420 and 520 nm (mean and standard deviation) and color difference (ΔE) of the extracts at 60 min according to ultrasonic intensity.

With the data of the Cielab coordinates, a^* , b^* and L^* , the Euclidean distances between two points were calculated, representing the color differences between the extracts. This difference was calculated as the magnitude of color change of

the extracts when the ultrasound was used against the color of the extract that was obtained only by conventional maceration. The color difference was obtained with the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2}$$

Where L (clarity), a (red / green coordinates, + a indicates red, - a indicates green) and b (coordinates yellow / blue, + b indicates yellow, - b indicates blue). L_0 , a_0 and b_0 were the values corresponding to the extract that was obtained without ultrasound, that is to say only by stirring. Table 6.3 shows the values of color difference of the extracts obtained by ultrasound with respect to the extract obtained by stirring.

Table 6.3. Color Difference (ΔE) and homogenous groups between extracts obtained by ultrasound assisted extraction (UAE) and conventional maceration.

UI (W.cm ⁻²)	ΔE
0	0 ^a
4.4	2.86 ^b
9.4	5.06 ^c
13.4	12.1 ^d
16.7	12.5 ^d

According to ΔE values (Table 6.3), it can be established if two samples are distinguishable by the human eye. When ΔE values are above 3, the samples are different in color for the human eye (Serratosa et al., 2008). The extracts obtained by ultrasound were different in color compared to the extracts obtained only by conventional maceration, although the extract recovered after UAE at 4.4 W cm⁻² was more difficult to distinguish (Figure 12). The results showed the existence of significant differences in color when ultrasonic intensity increased in all extraction processes except in the case of UAE at 13.4 and 16.7 W cm⁻² where no significant differences were underlined.

3.6. Antioxidant activity

Several studies confirmed that blueberries contain high antioxidant capacity compared to other fruits (Zheng et al., 2003; Wang et al., 2008; Prior et al., 1998).

The free radical scavenging activity was measured using the DPPH assay. DPPH is a highly colored free radical that can catch labile hydrogen atoms from phenolic antioxidants with simultaneous formation of a colorless hydrazine. The antioxidant capacity was estimated according to the method described by (Monzocco et al., 1998) with some modifications.

There are different ways of expressing antioxidant activity using this method. In the chapter based on the characterization of the Spanish blueberries (Chapter 1), the antioxidant activity was expressed in mmol Trolox / L. However, in this case, this method was used as a way to compare which extract was more antioxidant than another, without using any standard to express the value of the antioxidant activity. For this purpose, the antioxidant activity was expressed as the percent

DPPH inhibition (% AA). This parameter corresponded to the amount of DPPH radical neutralized by the extract at a certain concentration.

First, different concentrations of the extracts were prepared in order to make them react with the DPPH and obtain the relationship of the DPPH inhibition with the different extract concentrations. These concentrations must provide different absorbance values at 518 nm, that is, the different concentrations of prepared extracts must consume/inhibit DPPH in different concentrations, in order to be able to construct the linear regressions. The concentrations that were chosen were the following:

- ✓ 1L/L= extract
- ✓ 0.5 L/L= diluted extract ratio 1:2.
- ✓ 0.2 L/L= diluted extract ratio 1:5.

The percentage of antioxidant capacity inhibition (%AC) was obtained according to the following equation:

$$\%AA = 100 - \left(\frac{Abs\ sample - Abs\ Blank}{Abs\ control} \right) * 100$$

Where *Abs sample* is the absorbance of the sample at a given concentration, *Abs blank* is the absorbance of the pure solvent (methanol) and *Abs control* is the absorbance of the DPPH solution without any extract. From these data, using the linear relation between the extracts concentrations used and AA% obtained for each extract concentration, the IC₅₀ was calculated (concentration of the extract to inhibit 50% of DPPH). Figure 6.13 shows the DPPH inhibition of the extracts according to ultrasonic intensity.

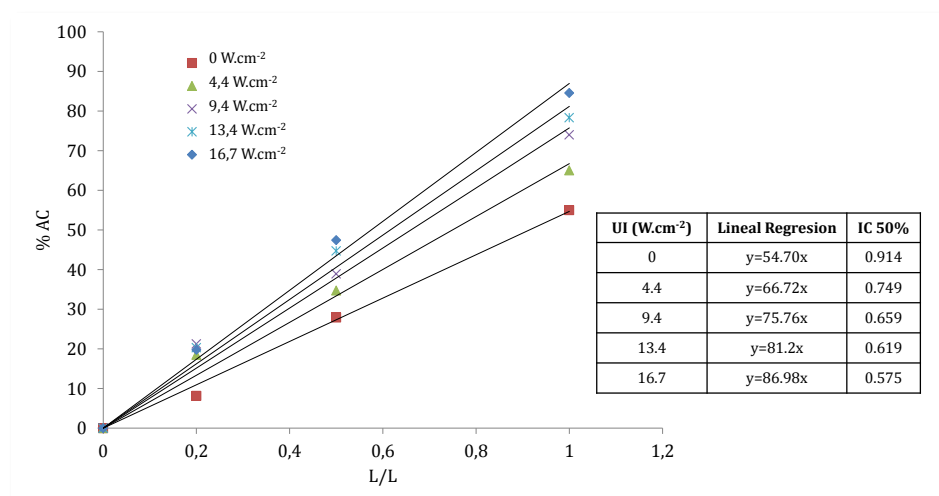


Figure 6.13. DPPH inhibition of the extracts at 60 min according to ultrasonic intensity.

On one hand, without the need to make any calculations it was possible to know that the values of the slopes of the lines showed that the extracts obtained by conventional maceration were less antioxidant than the extracts obtained by ultrasound, since in the latter the slopes of the straight lines were higher, indicating a higher value of the percentage of antioxidant capacity inhibition.

On the other hand, IC₅₀ can be taken as a way to express the value of antioxidant activity. In that, the higher the IC₅₀% value, the higher amount of extract is needed to inhibit or discolor 50% of the DPPH, so that less antioxidant will be the extract. Figure 6.14 shows the IC₅₀% decreasing when the ultrasound intensity was increased. This fact indicates an increase in antioxidant activity in the extracts obtained by UAE and stirring. This may be due to the fact that as the intensity of ultrasound was greater, more phenolic compounds were extracted or perhaps, new compounds were formed during the extraction process.

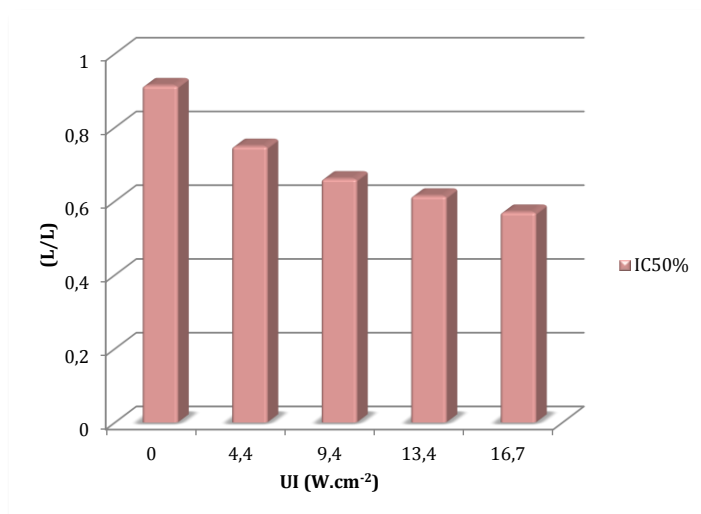


Figure 6.14. IC₅₀% values obtained for the extracts.

Some authors demonstrated that the major part of blackchokeberry extracts obtained by UAE had higher antioxidant capacity than non-sonicated extracts under the same conditions (Galvan d'Alessandro et al., 2012).

4. Conclusions

1. Shorter extraction time and less fossil energy are required to obtain the highest amount of phenolic compounds using UAE.
2. Monomeric anthocyanin content decreased after 60 min of extraction with the use of ultrasound, revealing a degradation phenomenon induced by technology.
3. However, the extracts obtained by this process presented higher TPC values and were more antioxidant than the extracts obtained by conventional maceration.
4. Lab parameters and absorbances at 420 and 520 nm showed a greater recovery of yellow and red compounds when the UI was higher.
5. More studies on the extraction parameters are required to elucidate the effect of UAE on the phenolic profile and color in red fruit by-products for its use in the food industry.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agu, R. C.; Bringhurst, T. A.; James M. Brosnan, J. M.; Jack, F. R. Effect of Process Conditions on Alcohol Yield of Wheat, Maize and Other Cereals. *J. Inst. Brew.* **2008**, *114*(1), 39–44.
2. Ahmed, M. U.; Dunn, J. A.; Walla, M. D.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Identification of N(ϵ)-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* **1986**, *263*, 8816–8821.
3. Al Bittar, S.; Périno-Issartier, S.; Dangles, O.; Chemat, F. An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. *Food Chem.* **2013**, *141*(3), 3268–72.
4. Álamo-Sanza, M.; Nevares Domínguez, I. Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods. Anthocyanin composition. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 255–263.
5. Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 238–254.
6. Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAD-ESI/ MSn. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 735–748.
7. Alen-Ruiz, F.; García-Falcon, M. S.; Pérez-Lamela, M. C.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gandara, J. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chem.* **2009**, *113*, 53–60.
8. Amidzic-Klaric, D.; Klaric, I.; Mornar, A. Polyphenol content and antioxidant activity of commercial blackberry wines from Croatia: application of multivariate analysis for geographic origin differentiation. *J. Food Nutr. Res.* **2011**, *50*, 199–209.
9. Anet, E. F. L. J. Degradation of carbohydrates I. Isolation of 3-deoxyhexosones. *Aust. J. Chem.* **1960**, *13*, 396–403.
10. Arozarena, I.; Ortiz, J.; Hermosín-Gutierrez, I.; Urretavizcaya, I.; Salvatierra, S.; Cordova, I.; Marín-Arroyo, M. R.; Noriega, M. J.; Navarro, M. Color, ellagitannins, anthocyanins, and antioxidant activity of andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) wines. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7463–7473.
11. Arthey, D.; Ashurst, P. R. Fruit processing. Springer. *Food Sci. Nutr.* **1996**.
12. Asenstorfer, R. E.; Lee, D. F.; Jones, G. P. Influence of structure on the ionisation constant of anthocyanins and anthocyanin-like wine pigments. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *563*, 10–14.
13. Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Structure of new dimeric acetaldehyde malvidin-3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6151–6153.
14. Bakker, J.; Bridle, P.; Honda, T.; Kuwano, H.; Saito, N.; Terahara, N.; Timberlake, C.F. Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1375–1382.

15. Bakker, J.; Picinelli, A.; Bridle, P. Model wine solutions: Colour and composition changes during ageing. *Vitis* **1993**, *32*, 111-118.
16. Baranowski, E. S.; Nagel, C. W. Kinetics of malvidin 3-glucoside condensation in model wine systems. *J. Food Sci.* **1983**, *48*, 419-421, 429.
17. Barba, F.J.; Brianceau, S.; Turk, M.; Boussetta, N.; Vorobiev, E. Effect of alternative physical treatments (ultrasounds, pulsed electric fields, and high-voltage electrical discharges) on selective recovery of bio-compounds from fermented grape pomace. *Food Bioproc. Tech.* **2015**, *8*, 1139-1148.
18. Bate-Smith, E. C.; Swain, T. Recent developments in the chemataxonomy of flavonoid compounds. *Lloydia* **1965**, *28*, 313-331.
19. Beecher, G. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3248s-3254s.
20. Behrends, A.; Weber, F. Influence of different fermentation strategies on the phenolic profile of bilberry wine (*Vaccinium Myrtillus L.*). *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7483-7490.
21. Bely, M.; Sablayrolles J. M.; Barre, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and interest. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*(4), 319-324.
22. Bely, M.; Masneuf-Pomarède, I.; Dubourdieu, D. Influence of physiological state of inoculum on volatile acidity production by *saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **2005**, *39*(4), 191-197.
23. Bilyk, A.; Sapers, G. M. Varietal differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **1986**, *34* (4), 585-588.
24. Borges, G.; Degeneve, A.; Mullen, W.; Crozier, A. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *58*, 3901-3909.
25. Borrelli, R. C.; Visconti, A.; Mennella, C.; Anese, M.; Fogliano, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6527-6533.
26. Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enology Vitic.* **2001**, *52*(2), 67-87.
27. Brossaud, F.; Cheynier, V.; Noble, A. C. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, *7*, 33-39
28. Brouillard, R.; Chassaing, S.; Fougèrousse, A. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochem.* **2003**, *64*(7), 1179-1186.
29. Brownlee, M.; Vlassara, H.; Cerami, A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.* **1984**, *101*, 527-537.

30. Burns, J.; Gardner, P. T.; Matthews, D.; Duthie, G. G.; Lean, M. E. J.; Crozier, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5797-5808.
31. Bustamante-Rangel, M.; Delgado-Zamarreño, M. M.; Lara Pérez-Martín, L.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Domínguez-Álvarez, J. Analysis of Isoflavones in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*(2), 391-411.
32. Caminiti, I.M.; Noci, F.; Muñoz, A.; Whyte, P.; Morgan, D.J.; Cronin, D.A.; Lyng, J.G. Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *Food Chem.* **2011**, *124*(4), 1387-1392.
33. Cao, S. Q.; Liu, L.; Pan, S. Y.; Lu, Q.; Xu, X. Y. A Comparison of two determination methods for studying degradation kinetics of the major anthocyanins from blood orange. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 245-249.
34. Carando, S.; Teissedre, P. L.; Pascual-Martínez, L.; Cabanis, J. C. Levels of flavan-3-ols in French wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4161-4166.
35. Carrera, C.; Ruiz-Rodríguez, A.; Palma, M.; Barroso, C. G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Anal. Chim. Acta.* **2012**, *732*, 100-104.
36. Casassa, F.; Catania, C. Piranoantocianos, nuevos pigmentos en los vinos tintos. *Enología* 2006, *3*, 1-23.
37. Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Gómez, M. V.; Verders, A. H.; Hermosín-Gutiérrez, I. Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 209-219.
38. Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 992-1002.
39. Castillo-Sánchez, J. X.; García-Falcon, M. S.; Garrido, J.; Martínez-Carballo, E.; Martins-Dias, L. R.; Mejuto, X. C. Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chem.* **2008**, *106*, 18-26.
40. Castrejón, A. D. R.; Eichholz, I.; Rohn, S.; Kroh, L. W.; Huyskens-Keil, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chem.* **2008**, *109*(3), 564-572.
41. Cavalcanti, R.N.; Santos, D.T.; Meireles, M.A.A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems. An overview. *Food Res. Int.* **2011**, *44* (2) 499-509.
42. Cerpa-Calderón, F. K.; Kennedy J. A. Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9006-9014.

43. Cevallos. C.; Bolyvar, A.; Cisneros-Zevallos. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chem.* **2004**, *86*, 69–67.
44. Che, J.; Suzuki, S.; Ishikawa, S.; Koike, H.; Ogiwara, I. Fruit ripening and quality profile of 64 cultivars in three species of blueberries grown in Tokyo. *Hort. Res.* **2009** *8*, 257-265.
45. Chemat, F.; Khan, M.K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, *18*(4), 813–835.
46. Chemat, F.; Fabiano-Tixier, A-S.; Abert Vian, M.; Allaf, T.; Vorobiev.; E. Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends Analyt. Chem.* **2015**, *71*, 157–168.
47. Cheminat, A; Brouillard, R. PMR investigation of 3-*O*-(β -d-glucosyl)malvidin structural transformations in aqueous solutions. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4457-4460.
48. Cheynier, V.; Moutounet, M. Oxidative reactions of caffeic acid in model systems containing polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2038-2044.
49. Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. Les composés hénoliques. In: *Oenologie, fondements scientifiques et technologiques*. Flazy, C., Ed.; Lavoissier Tec&Doc: Paris, **1998**, pp. 124-164.
50. Cheynier, V.; Ricardo Da Silva, J. M. Oxidation of grape procyanidins in model solution containing *trans*-caffeoyl tartaric acid and polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1047-1049.
51. Chinnici, F.; Sonni, F.; Natali, N.; Galassi, S.; Riponi, C. Colour features and pigment composition of Italian carbonic macerated red wines. *Food Chem.* **2009**, *113*, 651-657.
52. Cho, M. J.; Howard, L. R.; Prior, R. L.; Clark, J. R. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *84*, 1771-1782.
53. Chuyen, N. V. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Molec. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 1140-1149.
54. Cieslik, E.; Greda, A.; Adamus, W. Contents of phenolics in fruit and vegetables. *Food Chem.* **2006**, *94*, 135 – 142.
55. Ciolino, H. P.; Dashner, P. J.; Yeh, G. C. Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 *in vitro* by preventing activation of the aril hydrocarbon efector. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5707-5712.
56. Ciordia-Ara, M.; García Rubio, J. L; González de Lena, G. “El cultivo del arándano”. Ed. *SERIDA y KRK Ediciones*. Oviedo. **2007**. 120 pp.

57. Ciric, A.; Jelikic-Stankov, M.; Cvijovic, M.; Djurdjevic, P. Statistical optimization of an RP-HPLC method for the determination of selected flavonoids in berry juices and evaluation of their antioxidant activities. *Biomed. Chromatogr.* **2018**, *32*(4), e4150.
58. Cisse, M.; Vaillant, F.; Dornier, M.; Acosta, O.; Dhuique-Mayer, C. Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry and roselle, using the Arrhenius, Eyring and Ball models. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6285-6291.
59. Cocetta, G.; Karppinen, K.; Suokas, M.; Hohtola, A.; Häggman, H.; Spinardi, A.; Mignani, I.; Jaakola, L. Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development. *J. Plant Physiology*. **2012**, *169* 1059– 1065.
60. Comunidad Europea. Diario Oficial L272 de Octubre de 1990. *Ed. Mundi Prensa* **1990**. Madrid.
61. Connor, A. M.; Luby, J. J.; Tong, C. B. S. Variability in Antioxidant Activity in Blueberry and Correlations among Different Antioxidant Activity Assays. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2002**, *127*(2), 238-244.
62. Costa, D.V.T.A.; Almeida, D.P.F.; Pintado, M. Effect of postharvest application of ethylene on the profile of phenolic acids and anthocyanins in three blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum*). *J. Sci. Food Agric.* **2018**.
63. Côte, J.; Caillet, S.; Doyon, G.; Sylvain, J.; Lacroix, M. Analyzing cranberry bioactive compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *9*, 872-888.
64. Cotoras, M.; García, C.; Lagos, C.; Folch, C.; Mendoza, L. Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenoids isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **2001**, *46*, 433-440.
65. Crowell, E. A.; Ough, C. S. A modified procedure for alcohol determination by dichromate oxidation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1979**, *30*, 61-63.
66. Cruz, L.; Teixeira, N.; Silva, A. M. S.; Mateus, N.; Borges, J.; De Freitas, V. Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside-(+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10980-10987.
67. Cutzach, I.; Chatonnet, P.; Henry, R.; Dubourdieu, D. Identifying new volatile compounds in toasted oak. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1663-1667.
68. Cutzach, I.; Chatonnet, P.; Henry, R.; Pons, M.; Dubourdieu, D. Study in aroma of sweet natural non muscat wines 2nd part: Quantitative analysis of volatil compounds taking part in aroma of sweet natural wines during ageing. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1998**, *32*, 211-221.
69. Czibulya, Z.; Horváth, I.; Kollár, L.; Nikfardjam, M.P.; Kunsági-Máté S. The effect of temperature, pH, and ionic strength on color stability of red wine. *Tetrahedron*, **2015**, *71* (20), 3027-3031.
70. Czyzowska, A.; Pogorzelski, E. Changes to polyphenols in the process of production of must and wines from blackcurrants and cherries. Part II. Anthocyanins and flavanols. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 355–359.

71. Da Costa, C. T.; Nelson, B. C.; Margolis, S. A.; Horton, D. Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1998**, 799, 321-327.
72. Dallas, C.; Ricardo Da Silva, J. M.; Laureano, O. Interactions of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing malvidin-3-glucoside and acetaldehyde. *J. Sci. Food Agric.* **1996a**, 70, 493-500.
73. Dallas, C.; Ricardo Da Silva, J. M.; Laureano, O. Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2 and acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **1996b**, 44, 2402-2407.
74. Danilewicz, J. C. Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, 54, 73-85.
75. Danilewicz, J. C.; Seccombe, J. T.; Whelan, J. Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, 59, 128-136.
76. Darias-Martín, J.; Carrillo, M.; Diaz, E.; Boulton, R. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chem.* **2001**, 73, 217-220.
77. Darias-Martín, J.; Carrillo-López, M.; Echevarri-Granado, J. F.; Díaz-Romero, C. The magnitude of copigmentation in the color of aged red wines made in the Canary Islands. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, 224, 643-648.
78. Davies, A. J.; Mazza, G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 716-720.
79. De Freitas, V. A. P.; Glories, Y.; Monique, A. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, 51, 397-403.
80. De Freitas, V.; Mateus, N. Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401, 1467-1477.
81. De Wijk, R. A.; Prinz, J. F. The role of friction in perceived oral texture. *Food Qual. Prefer.* **2005**, 16, 121-129.
82. Del Caro, A.; Cacciottolo, A.F.; Fenu, P.A.M.; Piga, A. Polyphenols, colour and antioxidant activity changes in four Italian red wines during storage. *Acta Alimentaria*. **2010**, 39 (2), 192-210.
83. Del Rio, D.; Borges, G.; Crozier, A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Br. J. Nutr.* **2010**, 104, S67-S90.
84. Delgado-Andrade, C.; Seiquer, I.; Haro, A.; Castellano, R. Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chem.* **2010**, 122, 145-153.

85. Dharmadhikari, M. Wines from Cherries and Soft Fruits. *Vineyard Vintage View*. **1996**, *11*, 1-9.
86. Di Mattia, C.; Sacchetti, G.; Seghetti, L.; Piva, A.; Mastrocola, D. "Vino cotto" composition and antioxidant activity as affected by non enzymatic browning. *Ital. J. Food Sci.* **2007**, *19*, 413-424.
87. Drusch, S.; Faist, V.; Erbersdobler, H. F. Determination of N ϵ -carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem.* **1999**, *65*, 547-553.
88. Dubois, C.; Manginot, C. Effect of variety, year and grape maturity on the kinetics of alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 363-368.
89. Eck, P. Blueberry science. *Rutgers University Press*, **1988**.
90. Elattar, T. M.; Virji, A. S. Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation. *Anticancer Drugs*, **1999**, *10*, 187-193.
91. Escribano-Bailón, M. T.; Álvarez-García, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin-3-O-glucoside and (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1213-1217.
92. Escribano-Bailón, M. T.; Guerra, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Eur. Food Res. Technol.* **1995**, *200*, 221-224.
93. Escribano-Bailón, T.; Dangles, O.; Brouillard, R. Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1583-1592.
94. Escudero, A.; Asensio, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem.* **2002**, *77*, 325-331.
95. Espín, J. C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H. J.; García-Viguera, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1588-1592.
96. Es-Safi, N. E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J. Food Compos. Anal.* **2003**, *16*, 535-553.
97. Es-Safi, N. E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit-derived foods. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5571-5585.
98. Eun, J. K.; Young, S. L.; Murata, M.; Homma, S. Effect of pH control on the intermediates and melanoidins of nonenzymatic browning reaction. *Food Sci. Technol.* **2005**, *38*, 1-6.
99. Ferguson, A.; Carvalho, E.; Gourlay, G.; Walker, V.; Martens, S.; Salminen, J-P.; Constabel, C. P. Phytochemical analysis of salal berry (*Gaultheria shallon*

- Pursh.*), a traditionally-consumed fruit from western North America with exceptionally high proanthocyanidin content. *Phytochem.* **2018**, *147*, 203-210.
100. Ferreira, V.; Escudero, A.; Fernández, P.; Cacho, J. F. Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Eur. Food Res. Technol.* **1997**, *205*, 392-396.
 101. Fleschhut, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G.; Kulling, S. E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur. J. Nutr.* **2006**, *45*, 7-18.
 102. Floros, J.D.; Liang, H. Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. *Food Technol.* **1994**, *48*, 79-84.
 103. Francia-Aricha, E. M.; Guerra, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2262-2266.
 104. Francia-Aricha, E. M.; Guerra, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2262-2266.
 105. Francia-Aricha, E. M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. Effect of malvidin-3-monoglucoside on the browning of monomeric and dimeric flavanols. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *207*, 223-228.
 106. Frank, D.; Gould, I.; Millikan, M. Browning reactions during storage of lowmoisture Australian sultanas: evidence for arginine-mediated Maillard reactions. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2004**, *10*, 151-163.
 107. Frémont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* **2000**, *66*(8), 663-73.
 108. Fu, H.; Zhang, L.; He, B.; Yue, P.; Gao, X. Analysis of Organic Acids in Blueberry Juice and its Fermented Wine by High Performance Liquid Chromatography. *Adv. J. Food Sci. Technol.* **2015**, *9*(2): 127-134.
 109. Fu, M. X.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W. Thorpe, S. R. The advanced glycation end product, N ϵ -(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9982-9986.
 110. Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1401-1407.
 111. Furtado, P.; Figueiredo, P.; Neves, H. C. D.; Pina, F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *J. Photochem. Photobiol., A* **1993**, *75*, 113-118.
 112. Galvan d'Alessandro, L.; Kriaa, K.; Nikov, I.; Dimitrov, K. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Sep. Purif. Technol.* **2012**, *93*, 42-47.
 113. Gambuti, A.; Strollo, D.; Ugliano, M.; Lecce, L.; Moio, L. Trans-resveratrol, quercetin, (+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south italian

- monovarietal wines: Relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 5747-5751.
114. Gao, X.; Zhang, J.; Liu, H.; Li, N.; Yue, P. Influence of Low Temperature Enzyme Maceration Techniques on Volatile Compounds of Semi-dry Wine Made with cv. Premier of Rabbiteye Blueberries (*Vaccinium ashei*). *Adv. J. Food Sci. Technol.* **2015**, *7*(6), 442-448.
115. Garaguso, I.; Nardini, M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. *Food Chem.* **2015**, *179*, 336-342.
116. Garcia-Alonso, M.; Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. Evaluation of the antioxidant properties of fruits, *Food Chem.*, **2004**, *84*, 13-18.
117. García-Falcón, M. S.; Pérez-Lamela, C.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chem.* **2007**, *105*, 248-259.
118. García-Puente Rivas, E.; Alcalde-Eon, C.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M.T. Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *563*, 215-222.
119. García-Viguera, C.; Bridle, P. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chem.* **1999**, *64*, 21-26.
120. Gardner, P. T.; White, T. A.; McPhail, D. B.; Duthie, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food chem.* **2000**, *68*(4), 471-474.
121. Garrido, J.; Borges, F. Wine and grape polyphenols. A chemical perspective. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 3134-3148.
122. Garzón, G. A. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biol. Colomb.* **2008**, *13*(3), 27 - 36.
123. Garzón, G. A., Wrolstad, R. E. Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. *J Food Sci.* **2002**, *67*(4):1288-1299.
124. Gavrilo, V.; Kajdzanoska, M.; Gjamovski, V.; Stefova, M. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 4009-4018.
125. Gil, M.; Pascual, O.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Zamora, F.; Canals, J. M. Influence of berry size on red wine colour and composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*(2), 200-212.
126. Glomb M. A.; Pfahler, C. Synthesis of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose, a major hexose Maillard intermediate. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 515-523.

127. Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2e. Partie: Mesure, origine et interpretation. *Conn. Vigne Vin* **1984**, 18, 4, 253-271.
128. Gómez-Míguez, M.; González-Manzano, S.; Escribano-Bailón, M. T.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 5422-5429.
129. Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J. M.; Martínez, A. Color and Phenolic Compounds of a Young Red Wine. Influence of Wine-Making Techniques, Storage Temperature, and Length of Storage Time. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (3), 736-741.
130. Grace, M. H.; Esposito, D.; Dunlap, K. L.; Lila, M. A. Comparative Analysis of Phenolic Content and Profile, Antioxidant Capacity and Anti-inflammatory Bioactivity in Wild Alaskan and Commercial Vaccinium Berries. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62(18), 4007-4017.
131. Granadillo, I.; Tarantino-Rodríguez, G.; Rómulo Hernández-Motzezak, R.; Morán-Guillén, H. Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui*. *Multiciencias*. **2014**, 14(4), 375 - 381.
132. Gris, E.; Ferreira, E.; Falcao, L.; Bordignon-Luiz, M. T. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chem.* **2007**, 100, 1289-1296.
133. Hagerman, A.E.; Reidl, K.M.; Jones, G.A.; Sovik, K.N.; Ritchard, N.T.; Hartzfeld, P.W.; Riechel, T.L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1887-1892.
134. Hagl, S.; Deusser, H.; Soyalan, B.; Janzowski, C.; Will, F.; Dietrich, H.; Albert, F.; Rohner, S.; Richling, E. Colonic availability of polyphenols and D (-)-quinic acid after apple smoothie consumption. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, 3, 368-377.
135. Häkkinen, S. H.; Sirpa O. Kärenlampi, S.O.; I. Marina Heinonen, M.; Mykkänen, H. M.; Törrönen, A. R. Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2274-2279.
136. Häkkinen, S.H.; Törrönen, A.R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res. Int.* **2000**, 3, 517-524.
137. Hangun-Balkir, Y.; McKenney, M. L. Determination of antioxidant activities of berries and resveratrol. *J. Green Chem. Lett. Rev.* **2012**, 5(2), 147-153.
138. Harbourne, N.; Jacquier, J. C.; Morgan, D. J.; Lyng, J. G. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chem.* **2008**, 111, 204-208.
139. Haslam, E. In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* **1980**, 19, 2577-2582.
140. He, B.; Zhang, L.-L.; Yue, X.-Y.; Liang, J.; Jiang, J.; Gao, X.-L.; Yue, P.-X. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and

- anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chem.* **2016**, *204*, 70–76.
141. He, F.; Liang, N.-N.; Mu, L.; Pan, Q.-H.; Wang, J.; Reeves, M. J.; Duan, C.-Q. Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules* **2012**, *17*, 1571-1601.
142. He, F.; Pan, Q. P.; Shi, Y.; Duan, C. Q. Chemical synthesis of proanthocyanidins *in vitro* and their reactions in aging wines. *Molecules* **2008**, *13*, 3007-3032.
143. He, J.; Giusti, M. M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, *1*, 163-187.
144. Henle, T. Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids* **2005**, *29*, 313-322.
145. Heredia, F. J.; Francia-Aricha, E. M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Vicario, I. M.; Santos-Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes- I. pH effect. *Food Chem.* **1998**, *63*, 491-498.
146. Hermosín-Gutiérrez, I.; Sánchez-Palomo, L.; Vicario-Espinosa, A. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged wines made from the cultivars Cabernet Sauvignon, Cencibel y Syrah. *Food Chem.* **2005**, *92*, 269-283.
147. Hernández-Herrero, J. A.; Frutos, M. J. Degradation kinetics of pigment, colour and stability of the antioxidant capacity in juice model systems from six anthocyanin sources. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 2550-2557.
148. Hilbert, G.; Temsamani, H.; Bordenave, L.; Pedrot, E.; Chaher, N.; Cluzet, S.; Delaunay, J.-C.; Ollat, N.; Delrot, S.; Merillon, J.-M.; Gomes, E.; Richard, T. Flavonol profiles in berries of wild *Vitis* accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. *Food Chem.* **2015**, *169*, 49–58.
149. Hillmann, M. C. R.; Burin, V. M.; Bordignon-Luiz, M. T. Thermal degradation kinetics of anthocyanins in grape juice and concentrate. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 1997-2000.
150. Ho, P.; Da Silva, M. da. C.M.; Hogg, T.A. Changes in colour and phenolic composition during the early stages of maturation of port in wood, stainless steel and glass. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 1269-1280.
151. Hodge, J. E. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1953**, *1*, 928-943.
152. Hong-Guang, Y.; Zhang, W.-H.; Chen, J.-H.; Ding, Z.-E. Optimization of the alcoholic fermentation of blueberry juice by AS 2.316 *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11*(15), 3623-3630.
153. Hosseinian, F. S.; Beta, T. Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanin contents than other Manitoba berries. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *26*, 55(26), 10832-8.

154. Hsieh, T. C.; Wu, J. M. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* **1999**, *249*, 109-115.
155. Hung, C-M.; Liu, L-C.; Ho, C-T.; Ying-Chao Lin, Y-C.; Way, T-D. Pterostilbene Enhances TRAIL-Induced Apoptosis through the Induction of Death Receptors and Downregulation of Cell Survival Proteins in TRAIL-Resistance Triple Negative Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 11179–11191.
156. Ivanova, V.; Vojnoski, B.; Stefova, M. Effect of winemaking treatment and wine aging on phenolic content in Vranec wines. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, *49*, 161-172.
157. Jackson, R.S. Wine Science: Principles and Applications. *3rd ed., Academic Press*, **2008**, 776.
158. Jacotet-Navarro, M.; Rombaut, N.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Danguien, M.; Bily, A.; Chemat, F. Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary. *Ultrason. Sonochem.* **2015**, *27*, 102–109.
159. Jang, M.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exptl. Clin. Res.* **1999**, *25*, 65-77.
160. Jarvis, B. Cider, Perry, Fruit Wine and Other Alcoholic Fruit Beverages. In: Fruit Processing. Arthey, D. and Ashurt, P. (Eds). *Academic Press*. London. **1996**, 97-103.
161. Johnson, M. H.; Gonzalez de Mejia, E. Comparison of chemical composition and antioxidant capacity of commercially available blueberry and blackberry wines in Illinois. *J. Food Sci.* **2012**, *71*, 141–148.
162. Jordão, A. M.; Ricardo Da Silva, J. M.; Laureano, O. Evolution of catechins and oligomeric procyanidins during grape maturation of Castelhão Francês and Touriga Francesa. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001a**, *52*, 230-234.
163. Jordão, A. M.; Ricardo Da Silva, J. M.; Laureano, O. Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **2001b**, *40*, 17-22.
164. Jurd, L. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type pigments. In: Chichester CO, Editor. The Chemistry of Plant Pigments. *New York: Academic Press*, **1972**. 123-142.
165. Kallio, H.; Yang, W.; Liu, P.; Yang, B. Proanthocyanidins in wild sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries analyzed by reversed-phase, normal-phase, and hydrophilic interaction liquid chromatography with UV and MS detection. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 7721–7729.
166. Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M.N.; Vallis, L. Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Qual. Prefer.* **2001**, *12*, 145-152.

167. Kalt, W.; Forney, Charles F.; Martin, A.; Prior, R. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4638-4644.
168. Kennedy, J. A.; Waterhouse, A. L. Analysis of pigmented high-molecular mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *866*, 25-34.
169. Kilmartin, P. A.; Zou, H.; Waterhouse, A. L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1957-1965.
170. Kim, J. S.; Lee, Y. S. Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation of melanoidins as result of the Maillard reaction. *Food Chem.* **2008a**, *108*, 582-592.
171. Kim, J. S.; Lee, Y. S. Influence of pH on the antioxidant activity of melanoidins formed from different model systems of sugar/lysine enantiomers. *Food Sci. Biotechnol.* **2008b**, *17*, 1310-1315.
172. Kim, J.G.; Kim, H.L.; Kim, S.J.; Park, K.S. Fruit quality, anthocyanin and total phenolic contents, and antioxidant activities of 45 blueberry cultivars grown in Suwon, Korea. *J. Zhejiang University Science B (Biomed & Biotechnology)*. **2013**, *14*, 793-799.
173. Koca, I.; Karadeniz, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey, *Sci. Hort.*, **2009**, *121*, 447-450.
174. Koponen, J. M.; Happonen, A. M.; Mattila, P. H.; Törrönen, A. R. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1612-1619.
175. Langcake, P.; Pryce, R. J.; The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* **1976**, *9*, 77-86.
176. Larrauri, J. A.; Sánchez-Moreno, C.; Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red spanish wines. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47* (4), 1603-1606.
177. Lea, A. G. H. Bitterness and astringency: The procyanidins of fermented apple ciders. In: *Bitterness in food and beverages. Developments in food science*; R. L. Roussef, Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1990**, *25*, 123-143.
178. Ledl, F.; Schleicher, E. New aspects of the Maillard reaction in food and the human body. *Angewandte Chemie.* **1990**, *6*, 565-706.
179. Lee, B.H Fundamentos de Biotecnología de los Alimentos. *Editorial Acribia*. Zaragoza. España. **1996**.
180. Lee, J.; Wrolstad, R.E. Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *J. Food Sci.* **2004**, *69*(7), 564-573.

181. Li, H.; Guo, A.; Wang, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.* **2008**, *108*, 1-13.
182. Li, X.; Liu, H.; Lv, L.; Yan, H.; Yuan, Y. Antioxidant activity of blueberry anthocyanin extracts and their protective effects against acrylamide-induced toxicity in HepG2 cells. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2018**, *53*(1), 147-155.
183. Li, Y.; Yang, P.; Chang, Q.; Wang, J.; Liu, J.; Lv, Y.; Wang, T. Y. T.; Gao, B.; Zhang, Y.; Yu, L. L. Inhibitory Effect of Piceatannol on TNF- α -Mediated Inflammation and Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4634-4641.
184. Liao, H.; Cai, Y.; Haslam, E. Polyphenol interactions. Anthocyanins: Co-pigmentation and colour changes in red wines. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *59* (3), 299-305.
185. Lim, J. W.; Jeong J. T.; Shin, C.S. Component analysis and sensory evaluation of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Mique) wines. *Intl. J. Food Sci. Technol.* **2012**, *47*:918-26.
186. Liu, D.; Zhang, H.; Xu, B.; Tan, J. Influence of fermentation temperature and source of enzymes on enological characteristics of rice wine. *J. Inst. Brew.* **2014**; *120*, 231-237.
187. Lohachoompol, V.; Mulholland, M.; Szrednicki, G.; John Craske. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chem.* **2008**, *111*, 249-254.
188. López, J.; Uribe, E.; Vega-Gálvez, A.; Miranda, M.; Vergara, J.; Gonzalez, E.; Di Scala, K. Effect of air temperature on drying kinetics, vitamin c, antioxidant activity, total phenolic content, non enzymatic browning and firmness of blueberries variety O'neil. *Food Bioprocess. Technol.* **2010**, *3*, 772-777.
189. Los frutos del bosque o pequeños frutos en la cornisa cantábrica: el arándano. *Edita Gobierno de Cantabria. Consejería de Desarrollo Rural, Ganadería, Pesca y Biodiversidad.* **2011**.
190. Lu, R.; Serrero, G. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibit antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cell. *J. Cell Physiol.* **1999**, *179*, 297-304.
191. Lu, Y.; Foo, Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* **2001**, *75* (2), 197-202.
192. Lyons, M. M.; Yu, C.; Toma, R. B.; Cho, S. Y.; Reiboldt, W.; Lee, J.; van Breemen, R. B. Resveratrol in raw and baked Blueberries and Bilberries. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5867-5870.
193. Macheix, J. J.; Sapis, J. C.; Fleuriet, A. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1991**, *30*, 441-486.
194. Mailen-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective

- effects by intra- and intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 170-176.
195. Manzocco, L.; Mastrocola, D.; Nicoli, M.C. Chain-breaking and oxygen scavenging properties of wine as affected by some technological procedures. *Fd Res. int.* **1998**, *31*, 673-678.
196. Marchand, S.; De Revel, G.; Bertrand, A. Approaches to wine aroma: Release of aroma compounds from reactions between cysteine and carbonyl compounds in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4890-4895.
197. Markakis, P. Stability of Anthocyanins in Foods. In: *Anthocyanins as Food Colors*; Markakis, P., Ed.; Academic Press: New York, **1982**; Chapter 6.
198. Marković, J.M.D.; Petranović, N.A.; Baranac, J.M. The copigmentation effect of sinapic acid on malvin: A spectroscopic investigation on colour enhancement. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* **2005**, *78* (3), 223-228.
199. Marquez, A.; Serratos, M. P.; Merida, J. Pyranoanthocyanin derived pigments in wine: Structure and formation during winemaking. *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1-15.
200. Marquez, A.; Serratos, M. P.; Merida, J. Antioxidant activity in relation to the phenolic profile during the winemaking of sweet wines *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2014**, *49*, 2128-2135.
201. Marquez, A.; Dueñas, M.; Serratos, M. P.; Mérida, J. Formation of vitisins and anthocyanin-flavanol adducts during redgrape drying. *J. Agric. Food Chem.* **2012b**, *Article in Press*.
202. Marquez, A.; Serratos, M.P.; Lopez-Toledano, A.; Merida, J. Colour and phenolic compounds in sweet red wines from Merlot and Tempranillo grapes chamber-dried under controlled conditions. *Food Chem.* **2012**, *130*, 111-120.
203. Martin, L. J.; Matar, C. Increase of antioxidant capacity of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) during fermentation by a novel bacterium from the fruit microflora. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 9, 1477-1484.
204. Martin-Gomez, J.; Varo, M. A.; Merida, J.; Serratos, M.P. Bioactive compounds of chamber-dried blueberries at controlled temperature and wines obtained from them. *J. Chem.* **2017**, *2017*, 1-8.
205. Martins, S. I. F. S.; van Boekel, M. A. J. S. Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. *Food Chem.* **2003**, *83*, 135-142.
206. Martynenko, A.; Chen, Y. Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. *J. Food Eng.* **2016**, *171*, 44-51.
207. Mason, T.J. Large scale sonochemical processing: aspiration and actuality. *Ultrason. Sonochem.* **2000**, *7*(4), 145-149.
208. Mateus, N.; Marqués, S.; Gonaçalves, A. C.; Machado, J. M.; De Freitas, V. proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro

- Valley during ripening: Influence of cultivation altitude. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 115-121.
209. Mateus, N.; Oliveira, J.; González-Paramás, A. M.; Santos-Buelga, C.; De Freitas, V. Screening of portisins (vinylpyranoanthocyanin pigments) in port wine by LC/DAD-MS. *Food Sci. Technol. Int.* **2005**, *5*, 353-358.
210. Mateus, N.; Silva, A. M. S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C.; De Freitas, V. Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2110-2116.
211. Matsufuji, H.; Otsuki, T.; Takeda, T.; Chino, M.; Takeda, M. Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3157-3161.
212. Mazza, G.; Brouillard, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.* **1987**, *25*, 207-225.
213. Mazza, G.; Brouillard, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1097-1102.
214. Mazza, G.; Miniati, E. In: *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. Mazza, G.; Miniati, E., Eds.; CRC Press, Boca Raton: Florida, USA, **1993**.
215. Michalska, A.; Łysiak, G. Bioactive compounds of blueberries: post-harvest factors influencing the nutritional value of products. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18642-18663.
216. Mikulic-Petkovsek, M.; Schmitzer, V.; Slatnar, A.; Stampar, F.; Veberic, R. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *J. Food Sci.* **2012**, *77*(10), 1064-70.
217. Molina, J.M.; Calvo, D.; Medina, J.J.; Barrau, C.; Romero, F. Fruit quality parameters of some southern highbush blueberries (*Vaccinium xcorimbosum* L.) grown in Andalusia (Spain). *Span. J. Agricultural Res.* **2008**, *6*, 671-676.
218. Monagas, M.; Urpi-Sarda, M.; Sánchez-Patán, F.; Llorach, R.; Garrido, I.; Gómez, C.; Andres, C.; Bartolomé, B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Function.* **2010**, *3*, 233-253.
219. Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo Da Silva, J. M. Monomeric, oligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* **2003a**, *51*, 6475-6481.
220. Monagas, M.; Núñez, V.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003b**, *54*, 163-169.
221. Monzocco, L.; Anese, M.; Nicoli, M.C. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1998**, *31*, 694-698.

222. Morata, A.; Gómez-Cordovés, M.C.; Calderón, F.; Suárez, J. A. Effects of pH, temperature, and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *106*, 123-129.
223. Morata, A.; Calderón, F.; González, M.; Gómez-Cordovés, C.; Suárez, J. Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (Vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1144-1152.
224. Moreno-Labanda, J. F.; Mallavia, R.; Pérez-Fons, L.; Lizama, V.; Saura, D.; Micol, V. Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from Monastrell (*Vitis vinifera* L.) grape variety. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5396- 5403.
225. Moutounet, M.; Rabier, P.; Puech, J. L. ; Verette, E.; Barillère, J. M. Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine. *Sci. Aliments* **1989**, *9*, 35-51.
226. Moyer, R. A.; Hummer, K. E.; Finn, C. E.; Frei, B.; Wrolstad, R. E. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 519-525.
227. Mulero, J.; Pardo, F.; Zafrilla, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229*, 807-812.
228. Müller, D.; Schantz, M.; Richling, E. High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices, *J. Food Sci.* **2012**, *77*(4), 340-345.
229. Nave, F.; Teixeira, N.; Mateus, N.; De Freitas, V. The fate of flavanol-anthocyanin adducts in wines: Study of their putative reaction patterns in the presence of acetaldehyde. *Food Chem.* **2010**, *121*, 1129-1138.
230. Nicoué, E. E.; Savard, S.; Belkacemi, K. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*(14), 5626-35.
231. Nile, S. H.; Park, S. W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition.* **2014**, *30*, 134-144.
232. Nyman, N. A.; Kumpulainen, J. T. Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*(9), 4183-4187.
233. Nyyssonen, K.; Salonen, J.T.; Parviainen, M.T. Ascorbic acid. In: Leenheer, A.P.D., Lambert, E., Bocxlaer, J.F. (Eds.), *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. Marcel Dekker, New York. **2000**, 271-300.
234. Novo, M.; Beltran, G.; Torija, M.; Poblet, M.; Rozès, N.; Guillamón, J.; Mas, A. Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation,

- rehydration and low temperatura fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *86*, 153– 161.
235. Oancea, A. M.; Turturică, M.; Bahrim, G.; Râpeanu, G.; Stănciuc, N. Phytochemicals and antioxidant activity degradation kinetics during thermal treatments of sour cherry extract. *LWT – Food Sci. Technol.* **2017**, *82*, 139–146.
236. Odrizola-Serrano, I.; Hernández-Jover, T.; Martín-Belloso, O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem.* **2007**, *105*(3), 1151-1158.
237. OIV. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*: París, **2005**.
238. Oliveira, C. M.; Silva Ferreira, A. C.; De Freitas, V.; Silva, A. M. S. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1115-1126.
239. Oliveira, J.; Fernández, V.; Miranda, C.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.; De Freitas, V.; Mateus, N. Color properties of four cyanidin-pyruvic acid adducts. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6894-6903.
240. Oliveira, C.M.; Ferreira, A.C.S.; De Freitas, V.; Silva, A.M.S. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res. Int.* **2011**, *44* (5), 1115-1126.
241. Ortiz, J.; Marín-Arroyo, M-R.; Noriega-Domínguez, M-J.; Navarro, M.; Arozarena, I. Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus Benth.*), blueberry (*Vaccinium floribundum Kunth.*), and apple wines from Ecuador. *J. Food Sci.* **2013**, *78*(7), 985-993.
242. Parliament, E., Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council on Waste and Repealing Certain Directives. In Official Journal of the European Union, **2008**, L-312, 3-4.
243. Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Quantitative Analysis of Flavan-3-ols in Spanish Foodstuffs and Beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5331-5337.
244. Pati, S.; Liberatore, M. T.; Gambacorta, G.; Antonacci, D.; La Notte, E. Rapid screening for anthocyanins and anthocyanin dimers in crude grape extracts by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3864-3868.
245. Pati, S.; Losito, I.; Gambacorta, G.; La Notte, E.; Palmisano, F.; Zambonin, P. G. simultaneous separation and identification of oligomeric procyanidins and anthocyanin-derived pigments in raw red wine by HPLC-UV-ESI-MSn. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 861-871.
246. Payne, C.; Bowyer, P. K.; Herderich, M.; Bastian, S. E. P. Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells. *Food Chem.* **2009**, *115*, 551-557.

247. Pedroza, M.A.; Carmona, M.; Salinas, R.; Zalacain, A. Use of dehydrated Waste Grape skins as a natural additive for producing Rosé wines: study of extraction conditions and evolution. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 10976-10986.
248. Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimmers and trimers. *J. Sci. Food Agric.*, **1999**, *79*, 1123-1128.
249. Pellegrini, N.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Brenna, O.; Furio Brighenti, F.; Pietta, P. Polyphenol Content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48* (3), 732-735.
250. Pereira-Kechinski, C.; Guimaraes, P.V.R.; Noreña, C.P.Z.; Tessaro, I.C.; Marczak, L.D.F. Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *J. Food Sci.* **2010**, *75*(2), 173-176.
251. Perestrelo, R.; SilvaC. L. ; Silva, P.; Câmara, J.S. Impact of storage time and temperature on volatonic signature of Tinta Negra wines by LLME/GC-ITMS. *Food Res. Int.* **2018**, *109*, 99-111.
252. Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. L. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1181-1189.
253. Petigny, L.; Périno-Issartier, S.; Wajsman, J.; Chemat, F. Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *Int.l J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5750-5764.
254. Piffaut, B.; Kader, F.; Girardin, M.; Metche, M. Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chem.* **1994**, *50*, 115-120.
255. Piffaut, B.; Kader, F.; Girardin, M.; Metche, M. Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chem.* **1994**, *50*, 115-120.
256. Pingret, D.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Chemat, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control.* **2013**, *31*, 593-606.
257. Pingret, D.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Le Bourvellec, C.; Renard, C.M.G.C.; Chemat, F. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *J. Food Eng.* **2012**, *111*(1), 73-81.
258. Pinho, C.; Couto, A. I.; Valentão, P.; Andrade, P.; Ferreira, I.M.P.L.V.O. Assessing the anthocyanic composition of Port wines and musts and their free radical scavenging capacity. *Food chem.* **2012**, *131*(3), 885-893.
259. Pischetsrieder, A. M.; Schroeter, C.; Severin, T. Formation of an aminoreductone during the Maillard reaction of lactose with N- α -acetyllysine or proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 928-931.

260. Pissarra, J.; Lourenço, S.; González-Paramás, A. M.; Mateus, N.; Santos-Buelga, C.; De Freitas, V. Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions. *Anal. Chim. Acta*. **2004**, *513*, 215-221.
261. Poei-langston, M.S.; Wrolstad, R. E. Color Degradation in an Ascorbic Acid-Anthocyanin-Flavanol Model System. *J. Food Sci.* **1981**, *46*(4):1218-1222,1236.
262. Portenlänger, G.; Heusinger, H. Chemical reactions induced by ultrasound and c-rays in aqueous solutions of L-ascorbic acid. *Carbohydr. Res.* **1992**, *232*, 291-301.
263. Pradal, D.; Vauchel, P.; Decossin, S.; Dhulster, P.; Dimitrov., K. Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrason. Sonochem.* **2016**, *32*, 137-146.
264. Prasad, K. N.; Yang, B.; Dong, X.; Jiang, G.; Zhang, H.; Xie, H.; Jiang, Y. Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. *Innovat. FoodSci. Emerg. Tech.* **2009**, *10*, 627-632.
265. Prior, R. L.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; Mcewen, J.; O'brien, C. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of Vaccinium species. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2686-2693.
266. Proteggente, A. R.; Pannala, A. S.; Paganga, G.; Van Buren, L.; Wagner, E.; Wiseman, S.; Van De Put, F.; Dacombe, C.; Rice-Evans, C. A. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic. Res.* **2002**, *36*(2), 217-33.
267. Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Hanna-Leena Alakomi, H-L.; Oksman-Caldentey, K-M. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 8-18.
268. Ramonaityte, D. T.; Keršiene, M.; Adams, A.; Tehrani, K. A.; Kimpe, N. D. The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose-glycine model system. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 331-336.
269. Reque, P. M.; Steffens, R.S.; Jablonski, A.; H. Flores. S.; O. Rios, A. O.; De Jong, E. V. Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *J. Food Compos. Anal.* **2014**, *33* (2014) 111-116.
270. Ribeiro de Lima, M. T.; Waffo-Téguo, P.; Teissedre, P. L.; Pujolas, A.; Vercauteren, J.; Cabanis, J. C.; Mérillon, J. M. Determination of stilbenes (*trans*astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2666-2670.
271. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Les composés phénoliques. In: *Traité d'Œnologie, tome 2. Chimie du vin. Stabilisation et Traitements*; Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Eds.; Dunod: Paris, **1998**; 179-260.

272. Ribéreau-Gayon, P.; Stonestreet, E. Dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **1966**, *48*, 188-196.
273. Ricardo Da Silva, J. M.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Creminat, A.; Moutounet, M. Procyanidin dimmers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*. **1991b**, *30*, 1259-1264.
274. Rimando, A.M.; Kalt, W.; Magee, J.B.; Dewey, J.; Ballington, J.R. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in Vaccinium berries. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4713-4719.
275. Rios de Souza, V.; Pimenta Pereira, P.A.; Da Silva, T. L. T.; Oliveira Lima, L. C.; Pio, R.; Queiroz, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chem.* **2014**, *156*, 362-368.
276. Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M. Aggregation of grape seed tannins in model wine: effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* **2002**, *16*, 17-23.
277. Rivas-Gonzalo, J. C.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin-3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1444-1449.
278. Rivero-Pérez, M. D.; González-Sanjosé, M. L.; Ortega-Herás, M.; Muñiza, P. Antioxidant potential of single-variety red wines aged in the barrel and in the bottle. *Food Chem.* **2008**, *111*(4), 957-964.
279. Rives, J.C.; Santos, C.; Lock, O. Antocianos y Betalainas Química y estabilidad de antocianos. **2003**. Cap.2.
280. Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **1999**, *66*, 401-436.
281. Rodríguez Montealegre, R.; Romero Peces, R.; Chacón Vozmediano, J. L.; Martínez Gascueña, J.; García Romero, E. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 687-693.
282. Rodriguez-Mateos, A.; Cifuentes-Gomez, T.; Tabatabaee, S.; Lecras, C.; Spencer, J. P.E. Procyanidin, Anthocyanin, and Chlorogenic Acid Contents of Highbush and Lowbush Blueberries. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5772-5778.
283. Rombaut, N.; Tixier, A-S.; Bily, A.; Chemat, F. Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* **2014**, *14*, 530-544.
284. Romero, C.; Bakker, J. Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin and colour evolution. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2000**, *35*, 129-140.

285. Romero, C.; Bakker, J. Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3130-3139.
286. Rommel, A.; Wrolstad, R. E.; Heatherbell, D. A. Blackberry juice and wine: processing and storage effects on anthocyanin pigment composition color and appearance. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 385-91.
287. Rossetti, D.; Bongaerts, J. H. H.; Wantling, E.; Stokes, J. R.; Williamson, A.M. Astringency of tea catechins: More than an oral lubrication tactile percept. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 1984-1992.
288. Routray, W.; Orsat, V. Blueberries and Their Anthocyanins: Factors Affecting Biosynthesis and Properties. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **2011**, *10*, 303-320.
289. Rowland, L.J.; Nadim Alkharouf, N.; Darwish, O.; Ogden, E.L.; James J.; Polashock, J. J.; Bassil, N. V.; Main, D. Generation and analysis of blueberry transcriptome sequences from leaves, developing fruit, and flower buds from cold acclimation through deacclimation. *Plant Biology.* **2012**, 1-18.
290. Rupasinghe, H. P. V.; Clegg, S. Total antioxidant capacity total phenolic content mineral elements and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *J. Food Comp. Anal.* **2007**, *20*, 133-7.
291. Sadilova, E.; Carle, R.; Stintzing, F. C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*(12), 1461-1471.
292. Salas, E.; Atasanova, V.; Poncet-Legrand, C.; Meudec, E.; Mazauric, J. P.; Cheynier, V. Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Anal. Chim. Acta* **2004a**, *513*, 325-332.
293. Salas, E.; Dueñas, M.; Schwarz, M.; Winterhalter, P.; Cheynier, V.; Fulcrand, H. Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4536-4546.
294. Salas, E.; Fulcrand, H.; Meudec, E.; Cheynier, V. Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7951-7961.
295. Salas, E.; Le Guernevé, C.; Fulcrand, H.; Poncet-Legrand, C.; Cheynier, V. Structure determination and colour properties of a new directly linked flavanol-anthocyanin dimer. *Tetrahedron Lett.* **2004b**, *45*, 8725-8729.
296. Sanchez-Moreno, C.; Cao, G.; Ou, B.; Prior, R. L. Anthocyanin and proanthocyanidin Content in Selected White and Red Wines. Oxygen Radical Absorbance Capacity Comparison with Nontraditional Wines Obtained from Highbush Blueberry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4889-4896.
297. Santos, R. O.; Trindade, S. C.; Maurer, L. M.; Bersch, A. M.; Sautter, Neidi G. Penna, N. G. Physicochemical, Antioxidant and Sensory Quality of Brazilian Blueberry Wine. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* **2016**, *88*(3), 1557-1568.

298. Santos-Buelga, C.; Bravo-Haro, S.; Rivas-Gonzalo, J. C. Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in models solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **1995a**, *201*, 269-274.
299. Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E. M.; De Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J. C. Contribution to the identification of the pigments responsible for the browning of anthocyanin-flavanol solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 411-415.
300. Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Moutonet, M. Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid *o*-quinone with malvidin 3-*O*-glucoside. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1365-1369.
301. Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H.; Souquet, J.; Cheynier, V.; Moutonet, M. Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *J. Food Sci.* **1996**, *61*, 938-941.
302. Satora, P.; Sroka, P.; Duda-Chodak, A.; Tarko, T.; Tuszynski, T. The profile of volatile compounds and polyphenols in wines produced from dessert varieties of apples. *Food Chem.* **2008**, *111*, 513-9.
303. Saucier, C.; Jourdes, M.; Glories, Y.; Quideau, S. Extraction, detection, and quantification of flavano-ellagitannins and ethylvescalagin in a Bordeaux red wine aged in oak barrels. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7349-7354.
304. Schofield, P.; Mbugua, D.; Pell, A. Analysis of condensed tannins: a review. *Feed SCI Technol.* **2001**, *91*, 21-40.
305. Soot, E.; Steward, W. P.; Gescher, A. J.; Brown, K. Resveratrol in human cancer chemoprevention-choosing the 'right' dose. *Molec. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 7-13.
306. Sdiri, S.; Almudena Bermejo, A.; Aleza, P.; Pilar Navarro, P.; Alejandra Salvador, A. Phenolic composition, organic acids, sugars, vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 462-468.
307. Seeram, N. P. Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 627-629.
308. Sellapan, S.; Akoch, C. C.; Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant activity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2432-2438.
309. Seong-Yeop Jeong, S-Y.; Velmurugan, P.; Lim, J-M.; Oh, B-T.; Jeong, D-Y. Photobiological (LED light)-mediated fermentation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit with probiotic bacteria to yield bioactive compounds. *LWT.* **2018**, *93*, 158-166.
310. Serratos, M. P. Caracterización de la fracción colorante de vinos dulces Pedro Ximénez. Estudio de la etapa de pasificación de la uva en condiciones controladas. *Tesis doctoral, Universidad de Córdoba*, **2009**.

311. Serratosa, M.P.; López-Toledano, A.; Mérida, J.; Medina, M. Changes in color and phenolic compounds during the raisining of grape cv. Pedro Ximénez. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*(8), 2810–2816.
312. Serratosa, M.P.; Marquez, A.; Lopez-Toledano, A.; Medina, M.; Merida, J. Changes in hydrophilic and lipophilic antioxidant activity in relation to their phenolic composition during the chamber drying of red grapes at a controlled temperature. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1882–1892.
313. Shanmuganathan, M.; Li, P. C. H. Resveratrol analysis and degradation study in blueberry samples by HPLC with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2009**, *32*, 3038–3048.
314. Shinohara, T.; Saito, K.; Yanagida, S.; Goto, S. Selection and hybridization of wine yeasts for improved winemaking properties: Fermentation rate and aroma productivity. *J. Ferm. Bioeng.* **1994**, *77*(4), 428–431.
315. Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P.; Rodrigues, P.; Hogg, T. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5919–5924.
316. Simpson, K. L. Chemical changes in natural food pigments. In: *Chemical changes in food during processing*. Richardson, T.; Finley, J. W. Eds.; Van Nostrand Reinhold: New York, **1985**; pp. 409–441.
317. Singleton, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *38*, 69–77.
318. Singleton, V. L.; Esau, P. Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Adv. Food Res. Suppl.* **1969**, *1*, 1–261.
319. Singleton, V.L., Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*(3), 144–158.
320. Sioumis, N.; Kallithraka, S.; Tsoutsouras, E.; Makris, D. P.; Kefalas, P. Browning development in white wines: Dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *220*, 326–330.
321. Skrede, G.; Wrolstad, R. E.; Durst, R. W. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium Corymbosum* L.). *J. Food Sci.*, **2000**, *65*, 357–363.
322. Skrovankova, S.; Sumczynski, D.; Mlcek, J.; Tunde Jurikova, T.; Sochor, J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 24673–24706.
323. Smith, A. K.; June, H.; Noble, A. C. Effects of viscosity on the bitterness and astringency of grape seed tannin. *Food Qual. Prefer.* **1996**, *7*, 161–166.
324. Smith, M. A. L.; Marley, K. A.; Seigler, D.; Singletary, K. W.; Meline, B. Bioactive Properties of Wild Blueberry Fruits. *J. Food Sci.* **2000**, *65*(2), 352–356.

325. Somers, T. C. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2175-2184.
326. Somers, T. C.; Evans, M. E. Wine quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *J. Sci. Food Agri.* **1977**, *25*, 1369-1379.
327. Sondheimer, E.; Kertesz Z. I. Participation of Ascorbic Acid in the Destruction of Anthocyanin in Strawberry Juice and Model Systems. *Food Res.* **1953**, *18*:475.
328. Soto Vázquez, E.; Rio Segade, S.; Orriols Fernández, I. Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 789-802.
329. Stojanovic, J.; Silva, J.L. Influence of osmotic concentration, continuous high frequency ultrasound and dehydration on antioxidants, color and chemical properties of rabbiteye blueberries. *Food chem.* **2007**, *101*(3), 898-906.
330. Su, C. T.; Singleton, V. L. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 1553-1558.
331. Su, M. S.; P Chien, P. J. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chem.* **2007**, *104*, 182-187.
332. Su, M-S.; Silva, J. L. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation. *Food Chem.* **2006**, *97*, 447-451.
333. Sun, B.; Barradas, T.; Leandro, C.; Santos, C.; Spranger, I. Formation of new stable pigments from condensation reaction between malvidin 3-glucoside and (-)-epicatechin mediated by acetaldehyde: Effect of tartaric acid concentration. *Food Chem.* **2008**, *110*, 344-351.
334. Sun, B.; Belchior, G. P.; Ricardo Da Silva, J. M.; Spranger, M. I. Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. *J.Chromatogr. A* **1999**, *841*, 115-121.
335. Surh, Y. J.; Hurh, Y. J.; Kang, J. Y.; Lee, E.; Kong, G.; Lee, S. J. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, linepromyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett.* **1999**, *140*, 1-10.
336. Szajdek, A.; Borowska E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2008**, *63*(4), 147-56.
337. Tabaraki, R.; Heidarizadi, E.; Benvidi, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.* **2012**, *98*, 16-23.
338. Tao, J.; Dykes, S.I.; Kilmartin, P.A. Effect of SO₂ concentration on polyphenol development during red wine micro-oxygenation. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*(15), 6104-9.

339. Thornalley, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification – a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* **1996**, 27, 565–573.
340. Tiwari, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends Analyt. Chem.* **2015**, 71, 100–109.
341. Tiwari, B. K.; O'Donnell, C.P.; Patras, A.; Cullen, P.J. Anthocyanin and ascorbic acid degradation in sonicated strawberry juice. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56(21), 10071–10077.
342. Tlili, N.; Mejri, H.; Anouer, F.; Saadaoui, E.; Khaldi, A.; Nasri, N. Phenolic profile and antioxidant activity of Capparis spinosa seeds harvested from different wild habitats. *Ind. Crops Prod.* **2015**, 76, 930–935.
343. Toit, W. J. D.; Marais, J.; Pretorius, I. S.; Toit, M. D. Oxygen in must and wine-A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2006**, 27, 76–94.
344. Turturică, M.; Stănciuc, N.; Bahrim, G.; Râpeanu, R. Effect of thermal treatment on phenolic compounds from plum (*Prunus domestica*) extract – A kinetic study. *J. Food Eng.* **2016b**, 171, 200–207.
345. Turturică, M.; Stănciuc, N.; Bahrim, G.; Râpeanu, R. Investigations on sweet cherry phenolics degradation during thermal treatment based on fluorescence spectroscopy and inactivation kinetics. *Food Bioprocess Technol.* **2016a**, 9, 1706–1715.
346. UNE 87022:1992. Análisis sensorial. Utensilios. Copa para la degustación de vino. *Aenor* **1992**.
347. UNE-EN ISO 4120:2008. Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular (ISO 4120:2004). *Aenor* **2008**.
348. UNE-ISO 4121:2006. Análisis sensorial. Directrices para la utilización de escalas de respuestas cuantitativas (ISO 4121:2003). *Aenor* **2006**.
349. Varo, M.A.; Jacotet-Navarro, M.; Serratos, M. P.; Mérida, J.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Bily, A.; Chemat, F. Green ultrasound-assisted extraction of antioxidant phenolic compounds determined by high performance liquid chromatography from bilberry (*vaccinium myrtillus L.*) juice by-products. *Waste Biomass. Valor.* **2018**, <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0207-z>.
350. Vasantha Rupasinghea, H. P.; Clegg, C. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *J. Food Compos. Anal.* 2007, 20 (2), 133–137.
351. Vázquez-Flores, A.; Alvarez-Parrilla, E.; López-Díaz, J. A.; Wall-Medrano, A.; De La Rosa, L. A. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia.* **2012**, 6(2), 84–93.

352. Versari, A.; Boulton, R. B.; Parpinello, G. P. A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. *Food chem.* **2008**, *106*(1), 397-402.
353. Vidal, S.; Meudec, E.; Cheynier, V. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2004**, *52*, 7144-7151.
354. Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **2001**, *8*(3), 303-313.
355. Vivar-Quintana, A. M.; Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.; Rivas-Gonzalo, J. C. Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines. *Food Sci. Technol. Int.* **1999**, *5*, 347-352.
356. Vivar-Quintana, A. M.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 147-155.
357. Vivas, N.; Glories, Y. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 103-107.
358. Vrhovsek, U.; Masuero, D.; Palmieri, L.; Mattivi, F. Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. *J. Food Compos. Anal.* **2012**, *25*, 9-16.
359. Vrhovsek, U.; Masuero, D.; Palmieri, L.; Mattivi, F. Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. *J. Food Compos. Anal.* **2012**, *25*, 9-16.
360. Wang, Bo Chu.; He, Rui.; Li, Zhi Min. The Stability and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Blueberry. *Food Technol. Biotechnol.* **2010**, *48* (1) 42-49.
361. Wang, C. Y.; Chen, C. T.; Wang, S. Y. Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. *Food Chem.* **2009**, *117*, 426-431.
362. Wang, H. Y.; Qian, H.; Yao, W. R. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chem.* **2011**, *128*, 573-584.
363. Wang, S.Y.; Chen, C.; Sciarappa, W.; Wang, C.Y.; Camp, M.J. Fruit Quality, Antioxidant Capacity, and Flavonoid Content of Organically and Conventionally Grown Blueberries. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*(14), 5788-5794.
364. Wang, S.Y.; Chen, H.; Camp, M.J.; Ehlenfeldt, M.K. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Food Chem.* **2012**, *132*, 855-864.
365. Ward, O. Biotecnología de las Fermentaciones. *Editorial Acribia*, Zaragoza, España. **1991**, 136.
366. Waterhouse, A. L.; Laurie, V. F. Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 306-313.

367. Weenan, H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.* **1998**, *62*, 393–401.
368. Williamson, J.G.; Olmstead, J.W.; England, G.K. Lyrene, P.M. Southern Highbush Blueberry Cultivars from the University of Florida. Department of Horticultural Sciences, University of Florida. Document HS1245. **2014**. <http://edis.ifas.ufl.edu>
369. Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, *126*(2), 485-93.
370. Wrolstad, R.E.; Durst, R.; Lee, J. Tracking colour and pigment changes in anthocyanins. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 423-428.
371. Wu, R.; Frei, B.; Kennedy, J. A.; Zhao, Y. Effects of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of “Marion” and “Evergreen” blackberries. *J. Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 1253-1264.
372. Wu, Y.; Han, Y.; Tao, Y.; Fan, S.; Chu, D. T.; Ye, X.; Ye, M.; Xie, G. Ultrasound assisted adsorption and desorption of blueberry anthocyanins using macroporous resins. *Ultrason. Sonochem.* **2018**, *48*, 311-320.
373. Xanthopoulou, M. N.; Fragopoulou, E.; Kalathara, K.; Nomikos, T.; Karantonis, H. C.; Antonopoulou, S. Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. *Food Chem.* **2010**, *120*(3), 665-672.
374. Yan, H-G.; Zhang, W-H.; Chen, J-H.; Ding, Z-R. Optimization of the alcoholic fermentation of blueberry juice by AS 2.316 *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11*(15), 3623-3630.
375. Yang, C. S. T.; Atallah, W. A. Effect of four drying methods on the quality of intermediate moisture lowbush blueberries. **1985**, *50*(5), 1233-1237.
376. Yang, J.; Martinson, T. E.; HaiLiua, R. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food chem.* **2009**, *116* (1), 332-339.
377. Yang, W.; Guner, S.; Rock, C.; Anugu, A.; Sims, C.; GuProspecting, L. Antioxidant Capacities and Health-Enhancing Phytonutrient Contents of Southern Highbush Blueberry Wine Compared to Grape Wines and Fruit Liquors. *Sust. Agric. Res.* **2012**, *1*(1), 26-35.
378. Yu, M.; Wen, R.; Jiang, L.; Huang, S.; Fang, Z.; Chen, B.; Wang, L. Rapid analysis of benzoic acid and vitamin C in beverages by paper spray mass spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *268*, 411–415.
379. Zafra-Stone, S.; Yasmin, T.; Bagchi, M.; Chatterjee, A.; Vinson, J. A.; Bagchi, D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 675 – 683.
380. Zafrilla, P.; Morillas, J.; Mulero, J.; Cayuela, J. M.; Martínez-Cachá, A.; Pardo, F.; López Nicolás, J. M. Changes during storage in conventional and ecological

- wine: Phenolic content and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4694-4700.
381. Zamora, F. In: *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. Zamora, F. Ed.; Mundi-Prensa: Madrid, **2003**.
382. Zhang, L.; Li, N.; Gao, X. Phenolic compounds and antioxidant activity of wines fermented using ten blueberry varieties. *Am. J. Food Tech.* **2016**, *11*, 291-297.
383. Zhang, N.; Guo, Q.; Ma, Y. Stability of anthocyanin in wild blueberry fruit and its degradation kinetics. In: Zhu E (eds) *Information Technology and Agricultural Engineering. Advances in Intelligent and Soft Computing*. Berlin, Heidelberg: Springer, **2012**, *134*, 539-546.
384. Zhang, X-K.; He, F.; Zhang, b.; Reevesa, M. J.; Liu, Y.; Zhao, X.; Duan, C. Q. The effect of prefermentative addition of gallic acid and ellagic acid on the red wine color, copigmentation and phenolic profiles during wine aging. *Food Res. Int.* **2018**, *106*, 568-579.
385. Zheng, W.; Wang, S. Y. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 502-509.
386. Zimman, A.; Waterhouse, A. L. Incorporation of malvidin-3-glucoside into high molecular weight polyphenols during fermentation and wine aging. *Am. J. Enol.Vitic.* **2004**, *55*, 139-146.
387. Zoecklein, B.; Fugelsang, K. C.; Gump, B. H.; Nury, F. S. In: *Wine analysis and production*. Zoecklein, B.; Fugelsang, K. C.; Gump, B. H.; Nury, F. S. Eds.; Chapman & Hall: New York, **1995**.
388. Zou, H.; Kilmartin, P. A.; Inglis, M. J.; Frost, A. Extraction of phenolic compounds during vinification of Pinot Noir wine examined by HPLC and cyclic voltammetry. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2002**, *8*, 163-174.

ANEXO 1. TABLAS

Tabla 1. Concentración de derivados galactósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Definidín-3-O-galactósido	Cianidín-3-O-galactósido	Petunidín-3-O-galactósido	Peonidín-3-O-galactósido	Malvidín-3-O-galactósido
Jewel	162	n.d.	94.4	3.22	169
	162	n.d.	95.0	3.08	172
	162	n.d.	94.6	3.16	170
	162±0.306	n.d.	94.7±0.306	3.15±0.070	170±1.60
Millenia	220	21.6	132	13.7	237
	209	29.2	131	10.8	244
	214	25.4	132	10.3	240
	214±5.50	25.4±3.80	132±0.503	11.6±1.86	240±3.50
Star	150	44.4	78.8	10.8	115
	142	43.4	80.4	10.1	115
	146	44.0	79.6	10.5	115
	146±4.00	49.3±0.503	79.6±0.800	10.5±0.360	115±0.306
Windsor	189	16.4	121	6.66	207
	184	23.6	120	7.52	210
	187	20.0	120	7.10	209
	187±2.90	20.0±3.60	120±0.702	7.09±0.430	209±1.50

Tabla 2. Concentración de derivados glucósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Delfinidín-3-O-glucósido	Cianidín-3-O-glucósido	Petunidín-3-O-glucósido	Malvidín-3-O-glucósido
Jewel	121	9.62	n.d.	211
	119	9.20	n.d.	215
	120	9.40	n.d.	212
	120±1.20	9.41±0.210	n.d.	213±1.70
Millenia	100	12.6	n.d.	179
	91.4	9.54	n.d.	189
	95.6	11.1	n.d.	184
	95.7±4.30	11.1±1.51	n.d.	184±4.80
Star	6.72	2.58	21.8	11.2
	7.24	2.08	19.3	10.7
	6.98	2.32	20.6	10.9
	6.98±0.260	2.33±0.250	20.6±1.26	10.9±0.260
Windsor	47.4	4.26	n.d.	86.8
	48.4	4.22	n.d.	90.2
	48.0	4.28	n.d.	88.6
	47.9±0.503	4.25±0.031	n.d.	88.5±1.70

Tabla 3. Concentración de derivados arabinósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Delfinidín-3-O-arabinósido	Cianidín-3-O-arabinósido	Petunidín-3-O-arabinósido	Malvidín-3-O-arabinósido
Jewel	140	111	73.6	120
	140	109	73.8	122
	140	110	73.6	121
	140±0.115	110±1.10	73.7±0.115	121±1.30
Millenia	158.8	89.2	78.8	127
	147.4	88.4	85.8	132
	153.2	88.8	82.4	130
	153±5.70	88.8±0.400	82.3±3.50	130±2.60
Star	93.0	3.76	38.0	63.8
	93.8	2.98	37.4	63.6
	93.4	3.36	37.8	63.6
	93.4±0.400	3.37±0.390	37.7±0.306	63.7±0.115
Windsor	123	50.6	65.2	119
	125	50.4	68.4	123
	123	50.6	66.8	121
	124±1.27	50.5±0.115	66.8±1.60	121±2.20

Tabla 4. Concentración de agliconas y peonidín-3-O-pentósido (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Cianidina	Petunidina	Peonidina	Malvidina	Peonidín-3-pentósido
Jewel	n.d.	n.d.	n.d.	2.68	1.27
	n.d.	n.d.	n.d.	2.20	0.944
	n.d.	n.d.	n.d.	2.44	1.11
	n.d.	n.d.	n.d.	2.44±0.24	1.11±0.163
Millenia	n.d.	n.d.	n.d.	11.3	0.902
	n.d.	n.d.	n.d.	11.9	0.964
	n.d.	n.d.	n.d.	11.6	0.932
	n.d.	n.d.	n.d.	11.6±0.280	0.933±0.031
Star	0.478	0.272	1.38	2.94	1.78
	0.470	0.258	1.42	2.92	1.43
	0.462	0.264	1.40	2.94	1.60
	0.470±0.008	0.265±0.010	1.40±0.017	2.93±0.012	1.60±0.174
Windsor	n.d.	n.d.	4.3	3.20	1.22
	n.d.	n.d.	3.50	3.42	1.53
	n.d.	n.d.	3.66	3.30	1.18
	n.d.	n.d.	3.82±0.423	3.31±0.110	1.31±0.192

Tabla 5. Concentración de derivados galactósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las pieles de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Definidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O-galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
Jewel	860	55.6	3.75	27.4	880
	952	56.8	4.16	18.9	992
	904	56.0	3.96	23.2	936
	905±46.0	56.1±0.611	396±20.4	23.2±4.24	936±56.0
Millenia	114	108	728	76.8	1568
	132	120	840	66.4	1640
	123	94	784	51.2	1604
	1231±90.0	107±13.0	784±56.0	64.8±12.9	1604±36.0
Star	1150	366	620	94.4	931
	1108	345	604	78.6	885
	1127	357	613	86.7	918
	1128±21.0	356±10.6	612±8.00	86.6±7.90	911±23.7
Windsor	1072	172	628	78.4	1788
	1044	170	580	68.8	1720
	1060	144	604	73.6	1752
	1059±14.0	162±16.1	604±24.0	73.6±4.80	1753±34.0

Tabla 6. Concentración de derivados glucósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las pieles de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Delfinidín-3-O-glucósido	Cianidín-3-O-glucósido	Petunidín-3-O-glucósido	Malvidín-3-O-glucósido
Jewel	596	62.8	127.2	1084
	608	46.0	132.4	1076
	628	54.4	106.4	1072
	608±12.0	54.4±8.40	132±5.20	1075±10.0
Millenia	424	67.24	n.d.	1092
	520	76.4	n.d.	1172
	472	52.0	n.d.	1132
	472±48.0	65.2±12.3	n.d.	1132±40.0
Star	129	39.4	137	174
	117	36.6	131	152
	118	38.5	132	167
	121±6.66	38.2±1.43	133±3.21	164±11.2
Windsor	187	26.3	190	346
	169	22.2	182	318
	178	18.6	186	332
	178±9.00	22.4±3.82	186±4.20	332±14.0

Tabla 7. Concentración de derivados arabinósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las pieles de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Delfinidín-3-O- arabinósido	Cianidín-3-O-arabinósido	Petunidín-3-O- arabinósido	Malvidín-3-O-arabinósido
Jewel	740	560	350	680
	780	548	373	736
	760	556	360	708
	760±20.0	555±6.11	361±10.6	708±28.0
Millenia	848	436	424	868
	932	516	492	936
	892	476	460	900
	891±42.0	476±40.0	459±34.0	901±34.0
Star	689	85,2	304	581
	672	64,9	280	550
	683	75,1	294	563
	681±8.62	75.0±10.2	293±12.1	565±15.6
Windsor	720	208	488	1144
	728	188	432	1084
	736	168	460	1116
	728±8.00	188±20.0	460±28.0	1115±30.0

Tabla 8. Concentración de agliconas y peonidín-3-*O*-pentósido (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las pieles de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Cianidina	Petunidina	Peonidina	Malvidina	Peonidín-3-pentósido
Jewel	n.d.	n.d.	n.d.	48.8	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	75.2	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	77.6	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	67.2±16.0	n.d.
Millenia	n.d.	n.d.	n.d.	65.6	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	82.0	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	74.0	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	73.9±8.20	n.d.
Star	9.80	4.80	26.8	25.3	19.2
	7.30	3.70	25.9	24.0	9.5
	8.60	4.30	26.7	24.6	15.0
	8.53±1.27	4.23±0.535	26.5±0.493	24.6±0.651	14.6±4.86
Windsor	n.d.	n.d.	n.d.	23.2	69.6
	n.d.	n.d.	n.d.	17.8	69.2
	n.d.	n.d.	n.d.	24.5	69.6
	n.d.	n.d.	n.d.	21.8±3.53	69.5±0.231

Tabla 9. Concentración de derivados galactósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las pulpas de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Delfinidín-3-O-galactósido	Petunidín-3-O-galactósido	Malvidín-3-O-galactósido
Jewel	0.400	n.d.	2.21
	0.308	n.d.	2.23
	0.354	n.d.	2.22
	0.354±0.046	n.d.	2.22±0.01
Millenia	0.420	n.d.	1.02
	0.419	n.d.	1.04
	0.418	n.d.	1.03
	0.419±0.001	n.d.	1.03±0.011
Star	0.591	n.d.	0.790
	0.589	n.d.	1.11
	0.588	n.d.	0.950
	0.589±0.002	n.d.	0.950±0.160
Windsor	0.447	0.696	2.92
	0.449	0.368	2.90
	0.448	0.532	2.92
	0.448±0.01	0.532±0.164	2.91±0.012

Tabla 10. Concentración de derivados glucósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las pulpas de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Delfinidín-3-O-glucósido		Malvidín-3-O-glucósido	
Jewel		0,226		1,40
		0,254		2,68
		0,240		2,04
		0.240±0.014		2.04±0.638
Millenia		n.d.		0,658
		n.d.		0,820
		n.d.		0,738
		n.d.		0.739±0.081
Star		n.d.		n.d.
		n.d.		n.d.
		n.d.		n.d.
		n.d.		n.d.
Windsor		n.d.		n.d.
		n.d.		n.d.
		n.d.		n.d.
		n.d.		n.d.

Tabla 11. Concentración de derivados arabinósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en las pulpas de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Delfinidín-3-<i>O</i>-arabinósido	Malvidín-3-<i>O</i>-arabinósido
Jewel	0.516	1.12
	0.550	1.060
	0.532	1.09
	0.532±0.017	1.08±0.029
Millenia	n.d.	0.584
	n.d.	0.520
	n.d.	0.552
	n.d.	0.552±0.032
Star	0.812	0.816
	0.880	0.805
	0.846	0.812
	0.846±0.034	0.812±0.006
Windsor	0.644	2.40
	0.442	2.74
	0.542	2.58
	0.543±0.101	2.57±0.170

Tabla 12. Concentración de derivados de flavan-3-ol (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Procianidina B1	Catequina	Epicatequina	Epigallocatequina	Epigallocatequín-3-O-galato
Jewel	1.84	13.0	2.49	n.d.	14.5
	1.88	12.5	2.51	n.d.	14.4
	1.84	12.7	2.50	n.d.	16.1
	1.85±0.025	12.7±0.239	2.50±0.007	n.d.	15.0±0.973
Millenia	0.770	11.0	2.47	n.d.	3.25
	0.911	12.1	2.28	n.d.	2.97
	0.824	11.1	2.40	n.d.	3.72
	0.835±0.071	11.4±0.601	2.38±0.097	n.d.	3.31±0.380
Star	2.60	83.2	10.8	4.35	42.3
	2.73	86.6	10.5	3.44	40.8
	2.66	84.2	10.6	3.87	41.5
	2.66±0.070	84.6±1.77	10.7±0.147	3.89±0.452	41.5±0.742
Windsor	1.69	25.6	4.83	n.d.	5.92
	1.70	25.2	4.90	n.d.	5.78
	1.70	25.4	4.84	n.d.	5.83
	1.69±0.006	25.4±0.234	4.86±0.038	n.d.	5.84±0.074

Tabla 13. Concentración de derivados de flavan-3-ol (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar de las pieles cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Procianidina B1	Catequina	Epicatequina	Epigallocatequina	Epigallocatequín-3-O-galato
Jewel	9.76	50.8	5.42	16.2	35.5
	9.08	52.8	5.95	15.9	36.6
	9.53	51.7	5.56	15.8	36.3
	9.46±0.345	51.7±1.03	5.64±0.276	16.0±0.184	36.1±0.577
Millenia	4.18	40.1	8.88	6.35	20.4
	4.14	40.1	8.51	6.25	19.7
	4.16	40.1	8.40	6.29	19.8
	4.16±0.020	40.1±0.010	8.60±0.252	6.30±0.052	19.9±0.414
Star	8.40	95.4	12.7	6.82	79.9
	8.18	90.9	11.7	6.89	87.0
	8.27	92.6	12.2	6.85	82.9
	8.28±0.111	93.0±2.27	12.2±0.505	6.86±0.033	83.3±3.58
Windsor	10.6	94.4	12.3	13.0	60.0
	10.3	102	13.5	15.1	54.1
	10.5	98.3	12.8	13.5	57.9
	10.5±0.131	98.1±3.64	12.9±0.559	13.9±1.09	57.3±3.02

Tabla 14. Concentración de derivados de flavan-3-ol (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) las pulpas cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Prociainidina B1	Catequina	Epicatequina	Epigallocatequina	Epigallocatequín-3-O-galato
Jewel	0.575	3.67	2.11	n.d.	2.79
	0.574	3.71	1.86	n.d.	3.17
	0.573	3.69	1.96	n.d.	3.07
	0.574±0.001	3.69±0.019	1.98±0.126	n.d.	3.01±0.197
Millenia	0.350	6.15	1.79	n.d.	4.27
	0.355	6.11	1.83	n.d.	4.31
	0.352	6.12	1.81	n.d.	4.29
	0.352±0.003	6.13±0.023	1.81±0.023	n.d.	4.29±0.024
Star	1.08	31.3	7.02	2.20	19.1
	1.33	33.3	7.01	1.59	19.8
	1.12	31.4	8.44	1.69	16.9
	1.17±0.134	32.0±1.16	7.49±0.824	1.83±0.326	18.6±1.52
Windsor	1.05	23.4	4.14	n.d.	6.42
	1.02	23.7	4.08	n.d.	6.39
	1.04	23.6	4.11	n.d.	6.41
	1.04±0.001	23.6±0.110	4.11±0.026	n.d.	6.41±0.016

Tabla 15. Concentración de taninos totales (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) del fruto entero, la piel y la pulpa de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Fruto entero	Piel	Pulpa
Jewel	1973	4229	1268
	2022	4446	1059
	2084	4160	1013
	2026±55.5	4278±149	1113±136
Millenia	1701	3383	1044
	1572	3220	1102
	1469	3228	1121
	1581±116	3277±92.0	1089±40.2
Star	1969	5169	1736
	1867	5436	1952
	1655	5497	1848
	1830±161	5367±175	1845±108
Windsor	2165	4202	1214
	2161	4349	1175
	2083	4457	1214
	2136±46.1	4336±128	1201±22.3

Tabla 16. Concentración de flavonoles (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) del fruto entero y la piel de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Fruto entero		Piel		
	Quercetín-3-O-glucósido	Quercetín-3-O-glucurónido	Quercetín-3-O-glucósido	Kaempferol-3-O-glucósido	Kaempferol-3-O-glucurónido
Jewel	n.d.	87.4	90.0	29.6	30.0
	n.d.	104.6	89.2	23.6	34.6
	n.d.	86.0	89.6	26.6	32.2
	n.d.	92.7±10.4	89.6±0.400	26.6±3.00	32.3±2.30
Millenia	16.7	n.d.	112.4	31	n.d.
	17.3	n.d.	102.4	28	n.d.
	17.0	n.d.	106.4	29.2	n.d.
	17.0±0.290	n.d.	107±5.00	29.4±1.51	n.d.
Star	84.2	n.d.	562	22.6	16.6
	84.0	n.d.	569	22.2	16.5
	84.0	n.d.	566	22.4	16.5
	84.1±0.115	n.d.	566±3.40	22.4±0.200	16.5±0.020
Windsor	n.d.	n.d.	n.d.	24.8	44.8
	n.d.	n.d.	n.d.	24.2	38.6
	n.d.	n.d.	n.d.	24.6	41.6
	n.d.	n.d.	n.d.	24.5±0.306	41.7±3.10

Tabla 17. Concentración de ácido L-ascórbico, ácido dehidroascórbico y ácido ascórbico total (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Ácido L-ascórbico	Ácido dehidroascórbico	Ácido ascórbico total
Jewel	14.6	12.4	27.0
	14.7	12.9	27.6
	14.6	12.6	27.2
	14.6±0.013	12.6±0.282	27.3±0.295
Millenia	17.0	23.2	40.2
	16.9	23.9	40.8
	16.9	21.9	38.8
	16.9±0.019	23.0±1.00	39.9±1.00
Star	9.51	7.26	16.8
	9.19	7.78	17.0
	9.54	7.36	16.9
	9.41±0.193	7.47±0.277	16.9±0.105
Windsor	15.6	12.7	28.3
	15.6	13.9	29.5
	15.8	12.6	28.3
	15.7±0.097	13.1±0.738	28.7±0.669

Tabla 18. Concentración de ácido L-ascórbico, ácido dehidroascórbico y ácido ascórbico total (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) de la piel de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Ácido L-ascórbico	Ácido dehidroascórbico	Ácido ascórbico total
Jewel	16.2	52.2	68.4
	17.1	51.8	68.9
	16.8	54.6	71.4
	16.2±0.474	52.9±0.467	69.6±1.61
Millenia	20.1	31.1	51.2
	20.4	31.4	51.8
	19.0	34.6	53.6
	20.1±0.750	32.4±1.50	52.2±1.23
Star	22.0	27.1	49.2
	22.8	27.5	50.3
	23.0	26.6	49.6
	22.0±0.522	27.1±1.94	49.7±0.593
Windsor	30.8	39.1	69.9
	29.8	42.2	72.0
	30.3	45.4	75.7
	30.8±0.497	42.2±3.16	72.5±2.93

Tabla 19. Concentración de ácido L-ascórbico, ácido dehidroascórbico y ácido ascórbico total (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) de la pulpa de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Ácido L-ascórbico	Ácido dehidroascórbico	Ácido ascórbico total
Jewel	27.0	12.2	39.2
	27.4	13.6	41.0
	27.5	15.6	43.1
	27.0±0.307	13.8±1.70	41.1±1.98
Millenia	24.4	5.89	30.3
	24.3	5.82	30.1
	24.5	7.39	31.9
	24.4±0.098	6.37±0.885	30.8±0.978
Star	8.8	9.5	18.2
	8.7	9.3	18.0
	8.8	9.3	18.1
	8.80±0.037	9.30±0.102	18.1±0.116
Windsor	17.7	20.9	38.6
	17.4	22.9	40.3
	17.4	20.7	38.1
	17.7±0.141	21.5±1.22	39.0±1.17

Tabla 20. Valores de actividad antioxidante (mmol TE/ 100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) del fruto, la piel y la pulpa de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Fruto	Piel	Pulpa
Jewel	29.0	199	13.4
	29.1	201	13.2
	29.0	199	13.6
	29.0±0.051	200±1.29	13.4±0.170
Millenia	25.2	117	25.7
	25.4	119	26.5
	25.2	115	25.6
	25.3±0.115	117±2.02	23.4±0.254
Star	22.8	122	23.7
	23.1	122	23.2
	22.7	122	23.3
	22.9±0.189	122±0.312	11.8±0.179
Windsor	51.6	144	11.7
	51.6	145	12.0
	51.5	145	11.7
	51.6±0.059	145±0.555	11.8±0.179

Tabla 21. Concentración de resveratrol (µg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) del fruto entero y la piel de las cuatro variedades de arándanos estudiadas.

	Fruto	Piel
Jewel	46.0	297
	45.9	300
	46.0	303
	46.0±0.050	300±2.98
Millenia	39.4	146
	39.5	146
	39.5	146
	39.5±0.043	146±0.214
Star	21.9	44.5
	22.2	43.7
	22.5	42.9
	22.2±0.274	43.7±0.773
Windsor	44.3	101
	44.8	100
	45.2	100
	44.8±0.441	100±0.481

Tabla 22. Valores de pH (valores, media y desviación estándar) del zumo inicial y de los vinos 1, tras la obtención de la bebida (pH inicial), tras la adición de bicarbonato sódico y tras la adición de metabisulfito sódico.

	pH inicial	pH bicarbonato sódico	pH metabisulfito sódico
Zumo 1	2.78	-	-
	2.79	-	-
	2.78	-	-
	2.78±0.006		
V1P21	2.79	3.18	3.21
	2.77	3.17	3.22
	2.72	3.19	3.2
	2.76±0.036	3.18±0.010	3.21±0.010
V1T21	2.60	3.15	3.13
	2.61	3.15	3.13
	2.60	3.16	3.13
	2.60±0.006	3.15±0.006	3.13±0.000
V1P17	2.86	3.44	3.43
	2.86	3.44	3.44
	2.86	3.44	3.45
	2.86±0.000	3.44±0.000	3.44±0.010
V1T17	2.74	3.27	3.34
	2.75	3.31	3.32
	2.73	3.32	3.31
	2.74±0.010	3.30±0.026	3.32±0.015

Tabla 23. Valores de pH (valores, media y desviación estándar) del zumo inicial y de los vinos 2, tras la obtención de la bebida (pH inicial), tras la adición de bicarbonato sódico y tras la adición de metabisulfito sódico.

	pH inicial	pH bicarbonato sódico	pH metabisulfito sódico
Zumo 2	2.98	-	-
	2.97	-	-
	2.98	-	-
	2.98±0.007		
V2P21	2.64	3.15	3.16
	2.64	3.14	3.14
	2.64	3.16	3.17
	2.64±0.000	3.15±0.010	3.16±0.015
V2T21	2.9	3.31	3.33
	2.89	3.31	3.32
	2.9	3.31	3.31
	2.90±0.006	3.31±0.000	3.32±0.010
V2P17	2.6	3.02	3.02
	2.61	3.03	3.04
	2.6	3.04	3.03
	2.60±0.006	3.03±0.010	3.03±0.010
V2T17	2.44	2.82	2.82
	2.42	2.82	2.82
	2.43	2.82	2.82
	2.43±0.010	2.82±0.000	2.82±0.000

Tabla 24. Valores de acidez volátil (meq ácido acético/L) (valores, media y desviación estándar) de los zumos y vinos 1 y 2.

	meq ácido acético/L	meq ácido acético/L
Zumo 1	0.000 0.000 0.000 0.000±0.000	Zumo 2 0.000±0.000
V1P21	7.39 7.39 7.88 7.55±0.284	V2P21 3.94±0.000
V1T21	8.66 8.72 8.68 8.70±0.284	V2T21 7.39±0.000
V1P17	4.93 4.93 4.93 4.93±0.000	V2P17 3.61±0.284
V1T17	7.39 7.39 6.90 7.23±0.284	V2T17 5.42±0.000

Tabla 25. Concentración de azúcares reductores (g/L) (valores, media y desviación estándar) de los zumos y vinos 1 y 2.

	g/L		g/L
Zum o 1	203	Zum o 2	203
	203		203
	203		203
	203±0.000		203±0.000
V1P21	92.0	V2P21	92.0
	92.0		89.5
	92.0		89.5
	92.0±0.000		90.3±1.44
V1T21	0.000	V2T21	0.000
	0.000		0.000
	0.000		0.000
	0.000±0.000		0.000±0.000
V1P17	107	V2P17	92.0
	105		89.5
	110		94.5
	107±2.50		92.0±2.50
V1T17	0.000	V2T17	0.000
	0.000		0.000
	0.000		0.000
	0.000±0.000		0.000±0.000

Tabla 26. Grado alcohólico (%v/v) (valores, media y desviación estándar) de los zumos y vinos 1 y 2.

	Vino fermentación parcial		Vino Final	Vino fermentación parcial		Vino Final
Zumo 1	0.000	0.000	0.000	Zumo 2	0.000	0.000
	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000
	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000
	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000		0.000±0.000	0.000±0.000
V1P21	6.71	12.6	13.4		6.14	13.4
	6.76	12.7	13.5	V2P21	6.02	13.5
	6.72	12.7	13.2		5.95	13.2
	6.73±0.026	12.7±0.038	13.4±0.164		6.00±0.164	13.4±0.164
V1T21	0.000	12.6	12.5		0.000	12.5
	0.000	12.7	12.5	V2T21	0.000	12.5
	0.000	12.6	12.5		0.000	12.5
	0.000±0.000	12.6±0.064	12.5±0.030		0.000±0.000	12.5±0.030
V1P17	6.64	13.1	13.1		6.76	13.1
	6.66	13.2	11.9	V2P17	6.59	11.9
	6.67	13.0	12.2		5.15	12.2
	6.66±0.011	13.1±0.090	12.4±0.634		6.17±0.053	12.4±0.634
V1T17	0.000	13.2	12.8		0.000	12.8
	0.000	13.3	12.5	V2T17	0.000	12.5
	0.000	13.2	12.7		0.000	12.7
	0.000±0.000	13.3±0.027	12.7±0.147		0.000±0.000	12.7±0.147

Tabla 27. Valores de actividad antioxidante (mmol Trolox equivalente/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	mmol Trolox eq/L	mmol Trolox eq/L
Zumo 1	2.00 2.15 1.99 2.05±0.089	
V1P21	3.16 3.79 3.66 3.54±0.330	V1P21 C 3.28 3.78 3.78 3.61±0.285
V1T21	2.20 2.23 2.17 2.20±0.029	V1T21 C 2.51 2.23 2.17 2.31±0.180
V1P17	2.77 2.56 2.65 2.66±0.107	V1P17 C 2.79 2.95 3.13 2.95±0.172
V1T17	2.09 2.27 2.32 2.22±0.119	V1T17 C 2.79 2.69 3.15 2.88±0.242

Tabla 28. Actividad antioxidante (mmol Trolox equivalente/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	mmol Trolox eq/L	mmol Trolox eq/L
Zumo inicial 2	3.71 3.48 3.41 3.53±0.155	
V2P21	4.96 4.71 4.88 4.85±0.126	V2P21 C 5.32 4.96 5.30 5.19±0.200
V2T21	3.85 4.01 3.93 3.93±0.080	V2T21 C 3.86 4.08 3.99 3.98±0.113
V2P17	4.81 4.46 4.41 4.56±0.218	V2P17 C 4.75 4.73 4.77 4.75±0.020
V2T17	2.46 2.47 2.31 2.41±0.089	V2T17 C 2.49 2.47 2.59 2.52±0.064

Tabla 29. Concentración de taninos totales (g/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	g/L	g/L
Zumo 1	6.54	
	6.40	
	6.52	
	6.48±0.077	
V1P21	4.52	
	4.47	V1P21 C
	5.20	4.59
	4.73±0.409	4.73
V1T21	0.284	
	0.437	V1T21 C
	0.182	0.305
	0.301±0.128	0.448
V1P17	2.65	
	2.68	V1P17 C
	2.68	2.75
	2.67±0.018	2.69
V1T17	0.062	
	0.056	V1T17 C
	0.048	2.68
	0.055±0.007	2.71±0.038
		0.101
		0.095
		0.112
		0.102±0.009

Tabla 30. Concentración de taninos totales (g/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	g/L	g/L
Zumoz 2	7.83	
	7.89	
	7.87	
	7.86±0.030	
V2P21	2.33	
	2.12	V2P21 C
	2.17	2.64
	2.21±0.108	2.57
V2T21		2.63
		2.61±0.0330
	0.340	0.331
	0.336	0.332
V2P17	0.338	0.336
	0.338±0.002	0.333±0.003
	3.60	4.10
	3.77	3.96
V2T17	3.81	3.96
	3.72±0.113	4.01±0.078
	0.232	0.135
	0.213	0.348
V2T17	0.271	0.271
	0.238±0.030	0.251±0.108

Tabla 31. Concentración de ácido L-ascórbico (A-LA), ácido dehidroascórbico (A-DA) y vitamina C total (VCT) (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	A-LA	A-DA	VCT	A-LA	A-DA	VCT
Zumo1	4.44 4.44 4.45 4.44±0.004	6.66 6.66 6.66 6.66±0.003	11.1 11.1 11.1 11.1±0.001			
V1P21	6.04 6.05 6.06 6.05±0.009	0.953 0.921 0.936 0.936±0.016	6.99 6.97 7.00 6.99±0.013	V1P21 C 5.96 5.97 5.98 5.97±0.007	0.921 0.895 0.871 0.895±0.025	6.88 6.86 6.85 6.86±0.019
V1T21	7.39 7.39 7.39 7.39±0.003	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.	V1T21 C 7.12 7.12 7.18 7.14±0.032	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.
V1P17	5.53 5.54 5.56 5.54±0.013	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.	V1P17 C 5.50 5.50 5.49 5.50±0.007	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.
V1T17	5.96 5.96 5.98 5.97±0.010	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.	V1T17 C 5.87 5.88 5.89 5.88±0.009	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.

Tabla 32. Concentración de ácido L-ascórbico (A-LA), ácido dehidroascórbico (A-DA) y vitamina C total (VCT) (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	A-LA	A-DA	VCT	A-LA	A-DA	VCT
Zumo 2	5.88	8.91	14.8	V2P21 C	7.08	0.196
	5.90	8.92	14.8		7.06	0.203
	5.92	8.81	14.7		7.05	0.271
	5.90±0.022	8.88±0.062	14.8±0.044		7.06±0.013	0.233±0.042
V2P21	7.15	0.223	7.37	V2T21 C	8.02	n.d.
	7.15	0.272	7.42		8.02	n.d.
	7.15	0.296	7.44		8.00	n.d.
	7.15±0.000	0.264±0.037	7.41±0.037		8.01±0.012	n.d.
V2T21	8.19	n.d.	n.d.	V2P17 C	13.2	n.d.
	8.20	n.d.	n.d.		13.5	n.d.
	8.21	n.d.	n.d.		13.7	n.d.
	8.20±0.012	n.d.	n.d.		13.5±0.280	n.d.
V2P17	13.7	n.d.	n.d.	V2T17 C	13.7	n.d.
	13.8	n.d.	n.d.		13.8	n.d.
	13.9	n.d.	n.d.		13.7	n.d.
	13.8±0.065	n.d.	n.d.		13.7±0.044	n.d.
V2T17	13.9	n.d.	n.d.			
	13.8	n.d.	n.d.			
	13.9	n.d.	n.d.			
	13.8±0.058	n.d.	n.d.			

Tabla 33. Concentración de flavonoles (mg/L) (valores, media y desviación estándar) del zumo y V1P21 y V1T21 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	Quercetín-3-O-glucósido	Quercetín-3-O-glucurónido	Kaempferol-3-O-glucósido	Kaempferol-3-O-glucurónido
Zumo 1	0.827 0.795 0.802 0.808±0.017	7.13 7.14 7.13 7.13±0.004	3.16 3.13 3.14 3.14±0.015	2.25 2.23 2.22 2.23±0.017
V1P21	1.61 1.54 1.60 1.58±0.039	5.26 5.21 5.23 5.23±0.029	4.60 4.59 4.60 4.60±0.003	3.39 3.33 3.35 3.36±0.032
V1P21 C	1.32 1.33 1.32 1.33±0.002	4.56 4.59 4.58 4.57±0.014	3.85 3.87 3.86 3.86±0.010	2.71 2.72 2.71 2.71±0.009
V1T21	1.63 1.66 1.65 1.65±0.015	6.23 6.11 6.18 6.18±0.060	5.39 5.30 5.34 5.34±0.044	3.90 3.85 3.87 3.87±0.025
V1T21 C	1.49 1.56 1.53 1.53±0.037	5.82 5.96 5.88 5.89±0.071	4.65 4.78 4.74 4.72±0.062	3.35 3.45 3.37 3.39±0.051

Tabla 34. Concentración de flavonoles (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos V1P17 y V1T17 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	Quercetín-3-O-glucósido	Quercetín-3-O-glucurónido	Kaempferol-3-O-glucósido	Kaempferol-3-O-glucurónido
V1P17	1.10	4.60	2.46	1.91
	1.07	4.54	2.44	1.87
	1.09	4.56	2.45	1.90
	1.08±0.017	4.57±0.027	2.45±0.011	1.89±0.019
V1P17 C	1.08	5.17	2.86	2.19
	1.08	5.15	2.76	2.19
	1.08	5.15	2.83	2.19
	1.08±0.001	5.16±0.015	2.82±0.051	2.19±0.003
V1T17	1.09	5.11	3.61	2.97
	1.14	5.33	3.76	3.05
	1.11	5.25	3.68	3.00
	1.11±0.023	5.23±0.109	3.68±0.074	3.01±0.043
V1T17 C	0.813	3.56	2.45	2.00
	0.888	3.85	2.70	2.19
	0.852	3.71	2.61	2.11
	0.851±0.038	3.71±0.142	2.59±0.130	2.10±0.099

Tabla 35. Concentración de flavonoles (mg/L) (valores, media y desviación estándar) del zumo y V2P21 y V2T21 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	Quercetín-3-O-glucósido	Quercetín-3-O-glucurónido	Kaempferol-3-O-glucósido	Kaempferol-3-O-glucurónido
Zumo 2	1.91	8.90	3.88	3.15
	2.07	8.99	3.93	3.12
	2.00	8.93	3.92	3.11
	1.99±0.080	8.94±0.048	3.91±0.024	3.13±0.017
V2P21	2.35	8.00	4.34	4.21
	2.23	7.89	4.96	4.23
	2.29	7.92	4.72	4.21
	2.29±0.061	7.93±0.057	4.67±0.315	4.22±0.011
V2P21 C	2.10	7.62	4.26	3.90
	2.06	7.65	4.55	3.88
	2.08	7.64	4.37	3.88
	2.08±0.022	7.64±0.013	4.40±0.148	3.88±0.011
V2T21	1.78	6.33	5.07	4.35
	1.82	6.35	5.11	4.40
	1.80	6.33	5.09	4.36
	1.80±0.023	6.33±0.011	5.09±0.022	4.37±0.026
V2T21 C	1.97	6.91	5.34	4.63
	1.88	6.86	5.23	4.53
	1.94	6.90	5.27	4.57
	1.93±0.041	6.89±0.028	5.28±0.055	4.58±0.051

Tabla 36. Concentración de flavonoles (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos V2P17 y V2T17 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	Quercetín-3-O-glucósido	Quercetín-3-O-glucurónido	Kaempferol-3-O-glucósido	Kaempferol-3-O-glucurónido
V2P17	1.46	6.55	4.96	3.70
	1.44	6.49	4.94	3.65
	1.45	6.53	4.94	3.66
	1.45±0.008	6.52±0.031	4.95±0.014	3.67±0.025
V2P17 C	1.68	7.27	5.77	4.27
	1.64	7.25	5.73	4.19
	1.65	7.26	5.74	4.21
	1.66±0.020	7.26±0.014	5.75±0.020	4.22±0.040
V2T17	1.22	6.17	3.49	3.02
	1.23	6.17	3.48	2.95
	1.23	6.21	3.48	2.95
	1.23±0.005	6.18±0.025	3.48±0.007	2.98±0.041
V2T17 C	1.05	5.63	2.51	3.44
	1.04	5.54	2.72	3.45
	1.02	5.71	2.66	3.46
	1.04±0.015	5.63±0.085	2.67±0.050	3.45±0.010

Tabla 37. Absorbancias a 420 y 520 nm (valores, media y desviación estándar) del zumo y los vinos 1 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	A ₄₂₀	A ₅₂₀	A ₄₂₀	A ₅₂₀
Zumo 1	0.873 0.870 0.899 0.881±0.016	1.14 1.13 1.13 1.13±0.005		
V1P21	0.921 0.927 0.924 0.924±0.003	1.48 1.45 1.47 1.47±0.003	V1P21 C 0.638±0.027	0.485 0.531 0.541 0.519±0.030
V1T21	0.692 0.693 0.692 0.692±0.002	1.053 1.056 1.058 1.06±0.003	V1T21 C 0.608±0.027	0.526 0.526 0.525 0.525±0.002
V1P17	0.727 0.711 0.726 0.721±0.009	1.04 1.02 1.04 1.04±0.009	V1P17 C 0.427±0.002	0.205 0.205 0.204 0.205±0.001
V1T17	0.523 0.527 0.524 0.525±0.002	0.719 0.722 0.720 0.720±0.002	V1T17 C 0.389±0.002	0.198 0.201 0.200 0.200±0.002

Tabla 38. Absorbancias a 420 y 520 nm (valores, media y desviación estándar) del zumo y los vinos 2 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	A ₄₂₀	A ₅₂₀	A ₄₂₀	A ₅₂₀
Zumo 2	1.16 1.16 1.16 1.16±0.000	2.07 2.04 2.05 2.05±0.016		
V2P21	1.32 1.33 1.35 1.33±0.015	2.12 2.15 2.17 2.15±0.030	V2P21 C	0.828 0.832 0.830 0.830±0.002 0.658±0.005
V2T21	1.05 1.02 1.03 1.03±0.013	1.89 1.88 1.87 1.88±0.010	V2T21 C	0.767 0.769 0.772 0.769±0.003 0.680±0.002
V2P17	0.115 0.119 0.118 0.117±0.002	0.136 0.140 0.137 0.138±0.002	V2P17 C	0.118 0.112 0.113 0.114±0.003 0.103±0.004
V2T17	0.118 0.121 0.119 0.119±0.002	0.180 0.200 0.190 0.190±0.010	V2T17 C	0.098 0.098 0.099 0.098±0.001 0.118±0.002

Tabla 39. Absorbancias a 420 y 520 nm (u.a.) (valores, media y desviación estándar) del zumo y los vinos 2 y sus correspondientes vinos corregidos (vino C) con metabisulfito sódico y bicarbonato potásico.

	A_{520}		A_{520}	A_{520}		A_{520}
Zumo 1	0.195 0.194 0.195 0.195±0.001	- - - -		Zumo 2	0.216 0.212 0.218 0.215±0.003	- - - -
V1P21	0.246 0.247 0.237 0.243±0.006	0.343 0.342 0.342 0.342±0.000	V1P21 C	V2P21	0.237 0.231 0.231 0.233±0.003	0.318 0.318 0.318 0.318±0.000
V1T21	0.255 0.253 0.258 0.255±0.003	0.300 0.299 0.299 0.299±0.000	V1T21 C	V2T21	0.323 0.349 0.349 0.340±0.015	0.392 0.392 0.390 0.391±0.001
V1P17	0.229 0.231 0.230 0.230±0.001	0.280 0.284 0.283 0.283±0.002	V1P17 C	V2P17	0.328 0.341 0.331 0.333±0.007	0.362 0.374 0.362 0.366±0.007
V1T17	0.200 0.197 0.194 0.197±0.003	0.227 0.211 0.218 0.219±0.008	V1T17 C	V2T17	0.319 0.317 0.309 0.315±0.005	0.354 0.373 0.362 0.363±0.010

Tabla 40. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en el zumo y vinos 1 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Definidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O-galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
Zumo 1	0.639 0.647 0.640 0.642±0.004	n.d. n.d. n.d. n.d.	0.649 0.656 0.645 0.650±0.005	n.d. n.d. n.d. n.d.	5.82 5.89 5.79 5.83±0.047
V1P21	3.97 4.07 4.03 4.02±0.047	0.998 1.16 1.06 1.07±0.084	4.81 4.80 4.87 4.83±0.041	1.20 1.15 1.18 1.18±0.025	20.2 20.0 20.0 20.0±0.124
V1P21 C	1.96 1.80 1.97 1.91±0.097	0.727 0.776 0.771 0.758±0.027	2.71 2.46 2.68 2.62±0.134	0.738 0.812 0.809 0.786±0.042	11.4 10.4 10.9 10.9±0.522
V1T21	0.464 0.502 0.450 0.472±0.027	0.429 0.416 0.422 0.422±0.006	0.815 0.828 0.822 0.822±0.006	0.499 0.453 0.441 0.465±0.031	6.00 5.50 5.89 5.80±0.261
V1T21 C	0.669 0.674 0.671 0.671±0.003	0.445 0.457 0.445 0.449±0.007	0.795 0.800 0.796 0.797±0.003	0.432 0.434 0.431 0.433±0.002	5.54 5.49 5.55 5.52±0.033

Tabla 41. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados los vinos 1 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Definidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O- galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
V1P17	1.51	0.909	2.54	1.03	12.8
	1.51	0.922	2.63	0.899	13.5
	1.51	0.911	2.63	0.978	13.6
	1.51±0.001	0.914±0.007	2.60±0.058	0.968±0.064	13.3±0.453
V1P17 C	0.481	0.477	0.795	0.556	7.35
	0.460	0.476	0.864	0.520	6.59
	0.497	0.476	0.823	0.538	7.38
	0.479±0.019	0.476±0.001	0.827±0.035	0.538±0.018	7.11±0.448
V1T17	0.705	0.608	1.18	0.684	11.6
	0.887	0.609	1.34	0.677	11.2
	0.860	0.613	1.31	0.694	11.6
	0.817±0.098	0.610±0.003	1.28±0.083	0.685±0.009	11.5±0.220
V1T17 C	n.d.	n.d.	0.654	n.d.	5.42
	n.d.	n.d.	0.686	n.d.	4.89
	n.d.	n.d.	0.662	n.d.	5.01
	n.d.	n.d.	0.667±0.017	n.d.	5.11±0.274

Tabla 42. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en el zumo y vinos 2 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Definidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O- galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
Zumo 2	1.74	5.70	7.04	2.65	31.0
	1.50	4.59	5.84	2.20	26.0
	1.65	5.13	6.61	2.47	30.8
	1.63±0.124	5.14±0.555	6.50±0.608	2.44±0.224	29.3±2.80
V2P21	1.85	0.641	3.19	0.699	21.7
	2.05	0.659	3.00	0.686	20.5
	2.04	0.642	3.16	0.685	21.7
	1.98±0.113	0.647±0.010	3.12±0.103	0.690±0.008	21.3±0.656
V2P21 C	1.31	0.554	2.46	0.779	19.1
	1.39	0.631	2.23	0.603	18.3
	1.34	0.586	2.37	0.722	19.1
	1.35±0.038	0.590±0.039	2.35±0.118	0.701±0.090	18.9±0.441
V2T21	1.75	0.890	2.89	0.979	13.2
	1.59	0.870	2.49	0.953	13.6
	1.72	0.875	2.73	0.961	13.1
	1.68±0.086	0.878±0.010	2.70±0.201	0.964±0.014	13.3±0.262
V2T21 C	0.822	0.756	2.02	1.01	13.2
	0.826	0.763	2.00	0.956	10.8
	0.824	0.762	2.00	0.991	13.2
	0.824±0.002	0.760±0.004	2.01±0.011	0.987±0.029	12.4±1.37

Tabla 43. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en los vinos 2 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Delfinidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O- galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
V2P17	3.17	1.58	4.93	1.48	18.0
	3.45	1.49	5.10	1.55	19.1
	3.37	1.54	5.02	1.51	18.8
	3.33±0.145	1.54±0.048	5.02±0.086	1.51±0.035	18.6±0.540
V2P17 C	2.47	0.797	2.91	0.983	14.4
	2.71	0.926	2.84	1.03	13.9
	2.64	0.898	2.88	0.999	13.9
	2.61±0.124	0.874±0.068	2.88±0.035	1.00±0.021	14.1±0.284
V2T17	3.75	1.17	4.05	1.14	18.4
	3.75	1.17	4.05	1.14	18.5
	3.75	1.17	4.05	1.13	18.4
	3.75±0.002	1.17±0.002	4.05±0.003	1.14±0.004	18.4±0.051
V2T17 C	1.12	1.05	2.32	1.10	11.4
	1.24	1.26	2.67	1.24	12.2
	1.22	1.19	2.50	1.21	11.7
	1.19±0.066	1.17±0.105	2.50±1.76	1.19±0.074	11.8±0.380

Tabla 44. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores. media y desviación estándar) identificados en el zumo y vinos 1 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Delfinidín-3-O-glucósido	Cianidín-3-O-glucósido	Malvidín-3-O-glucósido
Zumo 1	1.31	n.d.	2.95
	1.31	n.d.	2.95
	1.31	n.d.	2.95
	1.31±0.002	n.d.	2.95±0.005
V1P21	3.37	0.995	11.6
	3.39	0.940	11.7
	3.38	0.880	11.7
	3.38±0.011	0.938±0.060	11.6±0.035
V1P21 C	1.64	0.652	6.06
	1.49	0.628	6.95
	1.58	0.646	6.85
	1.57±0.073	0.642±0.013	6.62±0.487
V1T21	0.660	0.433	3.69
	0.667	0.501	3.54
	0.661	0.471	3.62
	0.663±0.004	0.468±0.034	3.62±0.076
V1T21 C	0.709	0.415	3.39
	0.717	0.414	3.38
	0.717	0.413	3.39
	0.714±0.005	0.414±0.001	3.39±0.008

Tabla 45. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en los vinos 1 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Delfinidín-3-<i>O</i>-glucósido	Cianidín-3-<i>O</i>-glucósido	Malvidín-3-<i>O</i>-glucósido
V1P17	0.981 1.01 0.970 0.985±0.019	0.614 0.601 0.602 0.606±0.007	5.58 5.60 5.60 5.59±0.011
V1P17 C	0.388 0.380 0.382 0.383±0.004	0.347 0.336 0.345 0.343±0.006	3.29 3.01 3.12 3.14±0.142
V1T17	0.986 1.06 1.02 1.02±0.039	n.d. n.d. n.d. n.d.	4.70 4.56 4.58 4.61±0.077
V1T17 C	0.477 0.473 0.480 0.477±0.003	n.d. n.d. n.d. n.d.	2.33 2.31 2.32 2.32±0.012

Tabla 46. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en el zumo y los vinos 2 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Delfinidín-3-O-glucósido	Cianidín-3-O-glucósido	Malvidín-3-O-glucósido
Zumo 2	0.86 0.85 0.85 0.854±0.008	1.52 1.70 1.65 1.62±0.092	13.8 13.3 11.6 12.9±1.14
V2P21	3.30 3.04 3.06 3.13±0.143	0.851 1.07 1.07 0.995±0.124	12.3 11.5 12.3 12.0±0.487
V2P21 C	2.03 2.04 2.03 2.04±0.007	0.775 0.757 0.762 0.765±0.009	10.7 10.6 10.6 10.6±0.042
V2T21	1.33 1.20 1.26 1.23±0.065	0.823 0.851 0.837 0.837±0.014	5.86 7.04 6.33 6.41±0.593
V2T21 C	0.754 0.714 0.726 0.731±0.020	0.743 0.727 0.740 0.737±0.009	6.96 6.92 6.80 6.89±0.079

Tabla 47. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en los vinos 2 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Delfinidín-3-<i>O</i>-glucósido	Cianidín-3-<i>O</i>-glucósido	Malvidín-3-<i>O</i>-glucósido
V2P17	2.27	1.16	11.1
	2.35	1.22	11.1
	2.30	1.18	11.1
	2.31±0.037	1.18±0.035	11.1±0.014
V2P17 C	1.58	0.977	8.95
	1.58	0.953	8.50
	1.57	0.979	8.73
	1.58±0.001	0.970±0.014	8.73±0.228
V2T17	2.44	1.14	10.7
	2.44	1.15	10.9
	2.45	1.14	10.7
	2.44±0.005	1.14±0.002	10.8±0.122
V2T17 C	0.890	0.820	6.77
	1.10	0.960	7.31
	0.980	0.910	7.07
	0.989±0.105	0.899±0.074	7.05±0.268

Tabla 48. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en los vinos 1 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Delfinidín-3-O-arabinósido	Cianidín-3-O-arabinósido	Petunidín-3-O-arabinósido	Malvidín-3-O-arabinósido
Zumo 1	0.595 0.597 0.593 0.595±0.002	0.797 0.807 0.800 0.801±0.005	0.815 0.834 0.827 0.825±0.010	3.21 3.23 3.24 3.23±0.016
V1P21	2.44 2.23 2.33 2.30±0.105	4.351 4.34 4.33 4.34±0.012	2.55 2.69 2.65 2.63±0.073	13.2 13.5 13.4 13.4±0.128
V1P21 C	1.13 1.29 1.22 1.21±0.079	2.444 2.235 2.441 2.37±0.120	1.48 1.67 1.61 1.59±0.093	7.04 7.74 7.30 7.36±0.358
V1T21	0.476 0.520 0.500 0.498±0.022	1.24 1.21 1.23 1.22±0.016	0.654 0.710 0.663 0.676±0.030	4.37 4.04 4.36 4.25±0.181
V1T21 C	0.440 0.440 0.445 0.442±0.002	1.19 1.19 1.20 1.19±0.003	0.588 0.588 0.587 0.588±0.001	3.66 3.66 3.66 3.66±0.002

Tabla 49. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en los vinos 1 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Delфинidín-3-<i>O</i>-arabinósido	Cianidín-3-<i>O</i>-arabinósido	Petunidín-3-<i>O</i>-arabinósido	Malvidín-3-<i>O</i>-arabinósido
V1P17	1.18 1.02 1.19 1.13±0.097	1.72 1.61 1.67 1.67±0.054	1.50 1.30 1.48 1.43±0.106	7.85 7.84 7.85 7.85±0.003
V1P17 C	0.398 0.395 0.394 0.396±0.002	0.595 0.645 0.622 0.621±0.025	0.616 0.603 0.614 0.611±0.007	5.43 5.04 5.02 5.16±0.233
V1T17	0.649 0.637 0.641 0.642±0.006	1.60 1.53 1.60 1.58±0.038	1.00 0.850 0.951 0.934±0.075	7.50 7.41 7.42 7.44±0.052
V1T17 C	n.d. n.d. n.d. n.d.	0.815 0.850 0.828 0.831±0.018	0.631 0.608 0.621 0.620±0.012	4.01 4.21 4.09 4.10±0.102

Tabla 50. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en los vinos 2 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Delфинidín-3-<i>O</i>-arabinósido	Cianidín-3-<i>O</i>-arabinósido	Petunidín-3-<i>O</i>-arabinósido	Malvidín-3-<i>O</i>-arabinósido
Zumo 2	0.830	2.40	2.06	14.9
	0.720	2.06	2.30	12.7
	0.790	2.28	2.26	14.2
	0.781±0.055	2.25±0.170	2.21±0.133	13.9±1.15
V2P21	1.23	4.75	1.87	14.4
	1.11	4.50	1.66	14.3
	1.22	4.70	1.87	14.4
	1.19±0.067	4.65±0.129	1.80±0.123	14.4±0.091
V2P21 C	0.870	3.66	1.64	13.4
	0.740	3.70	1.68	13.3
	0.810	3.68	1.65	13.3
	0.807±0.067	3.68±0.020	1.66±0.021	13.3±0.034
V2T21	1.14	2.25	1.63	12.8
	1.06	1.99	1.49	11.7
	1.08	2.10	1.55	12.8
	1.10±0.043	2.12±0.128	1.56±0.066	12.4±0.625
V2T21 C	0.743	1.60	1.38	9.71
	0.775	1.62	1.34	9.94
	0.758	1.60	1.39	9.82
	0.758±0.016	1.61±0.010	1.37±0.028	9.82±0.113

Tabla 51. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores. media y desviación estándar) identificados en los vinos 2 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Delfinidín-3-O-arabinósido	Cianidín-3-O-arabinósido	Petunidín-3-O-arabinósido	Malvidín-3-O-arabinósido
V2P17	2.24 2.18 2.20 2.20±0.027	3.50 3.59 3.53 3.54±0.048	2.49 2.44 2.47 2.74±0.024	10.9 11.8 11.3 11.3±0.470
V2P17 C	1.16 1.20 1.18 1.18±0.021	2.91 2.84 2.84 2.86±0.041	1.60 1.63 1.61 1.61±0.015	9.11 9.07 9.12 9.10±0.025
V2T17	1.65 1.65 1.65 1.65±0.003	3.65 3.65 3.64 3.65±0.002	2.12 2.12 2.12 2.12±0.003	11.6 11.6 11.6 11.6±0.021
V2T17 C	0.795 0.949 0.875 0.873±0.077	1.74 1.91 1.82 1.82±0.086	1.27 1.24 1.25 1.25±0.016	7.73 8.18 7.97 7.96±0.225

Tabla 52. Concentración de agliconas y peonidin-3-pentósido (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en el zumo y en los vinos 1 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Cianidina	Petunidina	Peonidina	Malvidina	Peonidin-3-pentósido
Zumo 1	0.558	0.515	0.338	0.643	n.d.
	0.561	0.529	0.933	0.650	n.d.
	0.558	0.520	0.930	0.646	n.d.
	0.559±0.002	0.522±0.007	0.734±0.343	0.646±0.004	n.d.
V1P21	0.810	1.73	0.560	1.51	0.823
	0.760	1.80	0.529	1.47	0.754
	0.790	1.76	0.558	1.47	0.701
	0.787±0.025	1.76±0.031	0.549±0.017	1.48±0.022	0.759±0.061
V1P21 C	0.695	1.16	0.400	0.940	n.d.
	0.731	1.21	0.437	0.978	n.d.
	0.721	1.17	0.423	0.979	n.d.
	0.716±0.018	1.18±0.026	0.420±0.018	0.966±0.022	n.d.
V1T21	0.823	0.896	n.d.	0.695	0.555
	0.813	0.967	n.d.	0.717	0.537
	0.817	0.888	n.d.	0.718	0.546
	0.818±0.005	0.917±0.043	n.d.	0.710±0.013	0.546±0.009
V1T21 C	0.700	0.828	n.d.	0.573	0.531
	0.698	0.824	n.d.	0.594	0.533
	0.696	0.826	n.d.	0.574	0.529
	0.698±0.002	0.826±0.002	n.d.	0.580±0.012	0.531±0.002

Tabla 53. Concentración de agliconas y peonidín-3-pentósido (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en el zumo y en los vinos 1 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Cianidina	Petunidina	Peonidina	Malvidina	Peonidín-3-pentósido
V1P17	0.659	0.972	n.d.	0.890	0.601
	0.647	0.819	n.d.	0.845	0.613
	0.617	0.860	n.d.	0.886	0.605
	0.641±0.021	0.883±0.079	n.d.	0.870±0.024	0.606±0.006
V1P17 C	0.517	0.646	n.d.	0.688	0.518
	0.520	0.681	n.d.	0.640	0.521
	0.516	0.678	n.d.	0.677	0.516
	0.518±0.002	0.668±0.019	n.d.	0.668±0.026	0.518±0.002
V1T17	0.767	0.902	n.d.	0.625	n.d.
	0.818	0.814	n.d.	0.581	n.d.
	0.780	0.856	n.d.	0.618	n.d.
	0.788±0.0027	0.857±0.044	n.d.	0.608±0.024	n.d.
V1T17 C	0.654	0.719	n.d.	0.506	n.d.
	0.712	0.707	n.d.	0.468	n.d.
	0.662	0.714	n.d.	0.497	n.d.
	0.676±0.032	0.713±0.006	n.d.	0.490±0.019	n.d.

Tabla 54. Concentración de agliconas y peonidín-3-pentósido (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en el zumo y en los vinos 2 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Cianidina	Petunidina	Peonidina	Malvidina	Peonidín-3-pentósido
Zumo 2	1.56	1.15	0.580	1.85	n.d.
	1.45	0.981	0.547	2.07	n.d.
	1.48	1.08	0.565	1.90	n.d.
	1.50±0.056	1.07±0.086	0.564±0.016	1.94±0.120	n.d.
V2P21	1.37	1.96	0.567	1.58	n.d.
	1.05	1.59	0.561	1.55	n.d.
	1.36	1.81	0.558	1.56	n.d.
	1.26±0.184	1.79±0.185	0.562±0.004	1.56±0.017	n.d.
V2P21 C	1.27	1.79	0.548	1.37	n.d.
	1.21	1.71	0.540	1.31	n.d.
	1.23	1.75	0.556	1.36	n.d.
	1.24±0.030	1.75±0.041	0.548±0.008	1.34±0.031	n.d.
V2T21	0.860	1.34	0.588	1.05	0.72
	0.931	1.28	0.606	0.967	0.73
	0.861	1.34	0.594	1.02	0.72
	0.886±0.041	1.32±0.036	0.596±0.009	1.01±0.042	0.722±0.003
V2T21 C	1.01	1.38	0.546	1.18	0.701
	0.886	1.22	0.570	1.26	0.787
	0.991	1.34	0.556	1.21	0.706
	0.961±0.066	1.31±0.084	0.558±0.012	1.22±0.040	0.731±0.048

Tabla 55. Concentración de agliconas y peonidín-3-pentósido (mg/L) (valores, media y desviación estándar) identificados en el zumo y en los vinos 2 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Cianidina	Petunidina	Peonidina	Malvidina	Peonidín-3-pentósido
V2P17	0.831	1.92	0.617	1.79	0.865
	0.816	1.86	0.585	1.68	0.861
	0.822	1.87	0.605	1.73	0.865
	0.823±0.008	1.88±0.032	0.602±0.016	1.74±0.058	0.864±0.002
V2P17 C	0.910	1.01	0.560	1.137	n.d.
	0.984	1.03	0.572	1.19	n.d.
	1.01	1.02	0.565	1.138	n.d.
	0.967±0.050	1.02±0.010	0.566±0.006	1.15±0.029	n.d.
V2T17	0.923	1.63	0.639	1.39	n.d.
	0.921	1.63	0.630	1.39	n.d.
	0.926	1.63	0.641	1.39	n.d.
	0.923±0.003	1.63±0.002	0.637±0.006	1.39±0.003	n.d.
V2T17 C	0.887	1.35	0.628	1.29	0.796
	0.968	1.42	0.611	1.19	0.795
	0.935	1.37	0.617	1.24	0.790
	0.930±0.041	1.38±0.036	0.619±0.008	1.24±0.051	0.794±0.003

Tabla 56. Concentración de derivados de flavan-3-ol (mg /L) (valores, media y desviación estándar) identificados en el zumo y en los vinos 1 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

Epigallocatequín-3- O-galato		Epigallocatequina	Procianidina B1	Catequina	Procianidina B2	Epicatequina
Zumo 1	3.14	0.990	1,19	2.77	n.d.	0.346
	3.15	0.825	1,05	2.70	n.d.	0.384
	3.15	0.937	1,07	2.74	n.d.	0.362
	3.15±0.008	0.918±0.084	1.10±0.074	2.74±0.036	n.d.	0.364±0.019
V1P21	13.3	3.14	2.26	10.8	n.d.	1.52
	13.7	2.94	2.00	10.2	n.d.	1.59
	13.4	3.04	2.18	10.5	n.d.	1.52
	13.4±0.222	3.04±0.100	2.15±0.133	10.5±0.260	n.d.	1.54±0.040
V1P21 C	12.6	3.20	1.04	10.7	1.02	1.77
	12.7	3.21	1.05	10.7	1.02	1.69
	12.6	3.21	1.06	10.7	1.02	1.77
	12.7±0.055	3.21±0.007	1.05±0.008	10.7±0.034	1.02±0.000	1.74±0.048
V1T21	8.88	3.25	1.42	6.56	1.20	1.15
	8.83	3.62	1.06	6.17	1.09	1.61
	8.84	3.32	1.29	6.47	1.15	1.46
	8.85±0.026	3.40±0.196	1.26±0.185	6.40±0.205	1.14±0.058	1.41±0.234
V1T21 C	9.68	1.94	2.17	6.97	1.69	1.23
	10.1	3.03	2.06	7.14	1.91	1.40
	9.83	2.86	2.13	7.12	1.84	1.35
	9.88±0.227	2.61±0.587	2.12±0.055	7.08±0.095	1.81±0.114	1.32±0.089

Tabla 57. Concentración de derivados de flavan-3-ol (mg /L) (valores, media y desviación estándar) identificados en los vinos 1 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Epigallocatequín-3- O-galato		Epigallocatequina	Procianidina B1	Catequina	Procianidina B2	Epicatequina
V1P17	7.67		0.952	1.50	7.20	0.740	1.01
	6.74		0.914	1.31	7.11	0.681	1.08
	7.72		0.926	1.38	6.10	0.711	1.11
	7.37±0.553		0.931±0.019	1.40±0.096	6.80±0.611	0.710±0.031	1.07±0.054
V1P17 C	8.59		1.96	1.66	7.21	0.98	1.05
	8.62		1.94	1.56	6.86	0.95	1.01
	8.60		1.94	1.62	7.08	0.95	1.01
	8.60±0.014		1.95±0.011	1.62±0.047	7.05±0.180	0.957±0.016	1.02±0.022
V1T17	8.03		2.89	1.17	6.30	1.47	1.24
	7.37		2.78	1.10	6.93	1.16	1.22
	7.75		2.83	1.11	6.67	1.30	1.21
	7.71±0.329		2.83±0.055	1.13±0.036	6.63±0.319	1.31±0.157	1.22±0.014
V1T17 C	7.93		2.49	1.08	5.95	1.63	0.677
	7.82		3.30	1.10	6.17	1.02	0.763
	7.86		2.92	1.09	6.05	1.45	0.734
	7.87±0.053		2.90±0.403	1.09±0.010	6.06±0.113	1.37±0.309	0.725±0.044

Tabla 58. Concentración de derivados de flavan-3-ol (mg /L) (valores, media y desviación estándar) identificados en el zumo y en los vinos 2 obtenidos a 21 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

Epigallocatequín-3- O-galato		Epigallocatequina	Procianidina B1	Catequina	Procianidina B2	Epicatequina
Zumo 2	7.46	0.728	0.132	11.2	1.48	0.790
	7.59	1.10	0.175	10.4	1.33	0.664
	7.48	0.925	0.162	11.0	1.30	0.714
V2P21	7.51±0.071	0.917±0.185	0.156±0.022	10.9±0.408	1.37±0.094	0.723±0.063
	12.93	3.09	2.73	9.96	1.42	1.34
	12.32	2.26	2.44	10.4	1.42	1.10
V2P21 C	12.73	2.27	2.61	10.2	1.41	1.21
	12.7±0.309	2.54±0.476	2.59±0.148	10.2±0.239	1.41±0.002	1.22±0.124
	18.3	n.d.	2.02	12.5	2.25	n.d.
V2T21	19.5	n.d.	2.13	13.3	2.63	n.d.
	17.6	n.d.	1.88	13.0	2.22	n.d.
	18.4±0.939	n.d.	2.01±0.129	13.0±0.409	2.37±0.230	n.d.
V2T21	8.89	3.59	1.79	8.51	1.63	n.d.
	8.99	4.14	2.00	7.32	2.00	n.d.
	8.76	3.93	1.90	7.30	1.82	n.d.
V2T21 C	8.88±0.115	3.89±0.279	1.90±0.104	7.71±0.691	1.82±0.187	n.d.
	8.66	3.34	1.45	6.42	1.64	n.d.
	8.41	2.97	1.34	6.39	1.66	n.d.
V2T21 C	8.51	3.20	1.38	6.41	1.65	n.d.
	8.53±0.128	3.17±0.188	1.39±0.058	6.40±0.017	1.65±0.011	n.d.

Tabla 59. Concentración de derivados de flavan-3-ol (mg /L) (valores, media y desviación estándar) identificados en los vinos 2 obtenidos a 17 grados, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	Epigallocatequín-3- O-galato					Procianidina B1			Catequina		Procianidina B2		Epicatequina	
				Epigallocatequina										
V2P17	12.1			n.d.		2.09			8.70		1.48		0.983	
	13.4			n.d.		1.63			8.83		1.32		1.02	
	13.0			n.d.		1.86			8.63		1.51		0.999	
	12.8±0.648			n.d.		1.86±0.228			8.72±0.105		1.44±0.102		1.00±0.018	
V2P17 C	15.2			n.d.		1.92			10.6		2.32		1.09	
	14.7			n.d.		1.43			10.3		1.82		1.08	
	14.5			n.d.		1.73			10.5		2.21		1.08	
	14.8±0.377			n.d.		1.69±0.246			10.5±0.144		2.12±0.261		1.08±0.004	
V2T17	10.2			1.76		2.75			8.33		1.90		1.06	
	10.3			1.57		2.45			7.70		1.76		0.944	
	10.2			1.64		2.60			8.08		1.78		1.00	
	10.3±0.023			1.66±0.096		2.60±0.150			8.04±0.320		1.81±0.079		1.00±0.056	
V2T17 C	10.3			n.d.		2.68			2.07		2.30		1.94	
	10.5			n.d.		3.05			1.72		1.95		1.98	
	10.8			n.d.		2.71			2.27		1.96		1.51	
	10.5±0.237			n.d.		2.81±0.205			2.02±0.280		2.07±0.198		1.81±0.258	

Tabla 60. Color de pigmentos poliméricos (u.a.) (valores, media y desviación estándar) de los zumos y vinos 1 y 2, así como sus correspondientes vinos corregidos.

	A ₅₂₀		A ₅₂₀	A ₅₂₀		A ₅₂₀
Zumo 1	0.195	-	-	0.216	-	-
	0.194	-	-	0.212	-	-
	0.195	-	-	0.218	-	-
	0.195±0.001			0.215±0.003		
V1P21	0.246	0.343		0.237		0.318
	0.247	0.342		0.231		0.318
	0.237	0.342		0.231		0.318
	0.243±0.006	0.342±0.000		0.233±0.003	V2P21 C	0.318±0.000
V1T21	0.255	0.300		0.323		0.392
	0.253	0.299		0.349		0.392
	0.258	0.299		0.349		0.390
	0.255±0.003	0.299±0.000		0.340±0.015	V2T21 C	0.391±0.001
V1P17	0.229	0.280		0.328		0.362
	0.231	0.284		0.341		0.374
	0.230	0.283		0.331		0.362
	0.230±0.001	0.283±0.002		0.333±0.007	V2P17 C	0.366±0.007
V1T17	0.200	0.227		0.319		0.354
	0.197	0.211		0.317		0.373
	0.194	0.218		0.309		0.362
	0.197±0.003	0.219±0.008		0.315±0.005	V2T17 C	0.363±0.010

Tabla 61. Evolución de los valores de pH (valores. media y desviación estándar) de los vinos 1 y 2.

	4 Meses	8 Meses	12 Meses		4 Meses	8 Meses	12 Meses
V1P21	3.06 3.08 3.05 3.06±0.015	3.16 3.16 3.12 3.15±0.023	3.17 3.16 3.13 3.15±0.021	V2P21	3.15 3.16 3.17 3.16±0.010	3.18 3.16 3.19 3.18±0.015	3.19 3.18 3.19 3.19±0.006
V1T21	3.11 3.13 3.12 3.12±0.010	3.13 3.13 3.12 3.13±0.006	3.15 3.16 3.17 3.16±0.010	V2T21	3.14 3.12 3.13 3.13±0.010	3.14 3.16 3.15 3.15±0.010	3.15 3.16 3.16 3.16±0.006
V1P17	3.38 3.32 3.32 3.34±0.035	3.31 3.32 3.32 3.32±0.006	3.33 3.32 3.32 3.32±0.006	V2P17	3.21 3.22 3.22 3.22±0.006	3.21 3.23 3.22 3.22±0.010	3.28 3.33 3.27 3.29±0.032
V1T17	3.28 3.29 3.28 3.28±0.006	3.21 3.25 3.25 3.24±0.023	3.26 3.24 3.23 3.24±0.015	V2T17	3.33 3.28 3.33 3.32±0.029	3.29 3.28 3.21 3.26±0.044	3.21 3.22 3.21 3.21±0.006

Tabla 62. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 4 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O-galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
V1P21	0.844	0.453	1.31	n.d.	5.48
	0.696	0.529	1.32	n.d.	4.87
	0.824	0.506	1.11	n.d.	5.30
	0.788±0.080	0.496±0.039	1.25±0.118	n.d.	5.21±0.315
V1T21	0.560	0.411	0.929	n.d.	4.79
	0.546	0.400	0.966	n.d.	5.88
	0.554	0.401	0.949	n.d.	5.67
	0.554±0.007	0.404±0.006	0.948±0.019	n.d.	5.45±0.580
V1P17	0.915	0.646	0.827	0.947	4.05
	0.906	0.649	0.831	0.935	4.14
	0.910	0.647	0.835	0.946	3.93
	0.910±0.005	0.647±0.002	0.831±0.004	0.943±0.007	4.04±0.102
V1T17	0.520	n.d.	1.02	n.d.	4.25
	0.521	n.d.	0.904	n.d.	4.19
	0.519	n.d.	0.978	n.d.	4.23
	0.520±0.001	n.d.	0.966±0.057	n.d.	4.22±0.030

Tabla 63. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 4 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O- galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
V2P21	0.902	0.617	1.59	0.892	10.3
	0.695	0.609	1.93	0.886	12.1
	0.860	0.614	1.75	0.893	11.2
	0.819±0.109	0.614±0.004	1.76±0.170	0.890±0.004	11.2±0.917
V2T21	0.686	n.d.	1.27	n.d.	8.34
	0.682	n.d.	1.27	n.d.	8.34
	0.691	n.d.	1.27	n.d.	8.32
	0.686±0.004	n.d.	1.27±0.003	n.d.	8.33±0.015
V2P17	1.04	1.06	1.96	1.24	9.30
	1.04	1.06	1.96	1.22	9.26
	1.04	1.05	1.95	1.23	9.22
	1.04±0.002	1.06±0.004	1.96±0.004	1.23±0.006	9.26±0.038
V2T17	0.908	0.572	1.40	0.892	7.30
	0.904	0.565	1.40	0.893	7.69
	0.906	0.569	1.41	0.885	7.43
	0.906±0.002	0.569±0.004	1.40±0.006	0.890±0.005	7.47±0.201

Tabla 64. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 8 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O- galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
V1P21	0.619	n.d.	1.63	n.d.	4.44
	0.622	n.d.	1.63	n.d.	4.02
	0.619	n.d.	1.62	n.d.	4.31
	0.620±0.002	n.d.	1.63±0.003	n.d.	4.26±0.214
V1T21	n.d.	n.d.	0.578	n.d.	1.40
	n.d.	n.d.	0.580	n.d.	1.41
	n.d.	n.d.	0.578	n.d.	1.40
	n.d.	n.d.	0.579±0.001	n.d.	1.41±0.007
V1P17	n.d.	n.d.	1.12	n.d.	4.70
	n.d.	n.d.	1.14	n.d.	4.81
	n.d.	n.d.	1.13	n.d.	4.83
	n.d.	n.d.	1.13±0.008	n.d.	4.78±0.067
V1T17	0.456	n.d.	0.674	n.d.	3.97
	0.482	n.d.	0.622	n.d.	4.06
	0.470	n.d.	0.654	n.d.	4.02
	0.469±0.013	n.d.	0.650±0.026	n.d.	4.02±0.046

Tabla 65. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 8 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O- galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
V2P21	0.518	n.d.	1.53	0.897	8.34
	0.509	n.d.	1.52	0.877	8.53
	0.526	n.d.	1.50	0.875	8.49
	0.518±0.008	n.d.	1.51±0.016	0.883±0.012	8.46±0.103
V2T21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.25
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.24
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.25
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.25±0.009
V2P17	0.499	0.276	1.23	0.838	5.56
	0.527	0.276	1.25	0.689	5.62
	0.477	0.276	1.24	0.813	5.51
	0.501±0.025	0.276±0.000	1.24±0.009	0.780±0.080	5.57±0.055
V2T17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.68
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.66
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.67
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.67±0.012

Tabla 66. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 12 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O- galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
V1P21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.93
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.01
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.99
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.98±0.040
V1T21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V1P17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.05
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.68
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.78
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.84±0.188
V1T17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 67. Concentración de derivados galactósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 12 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O- galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
V2P21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.38
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.30
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.75
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.48±0.241
V2T21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V2P17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.91
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.82
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.84
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.86±0.049
V2T17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 68. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 4 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido
V1P21	0.881	0.487	3.62
	0.723	0.511	3.60
	0.790	0.489	3.60
	0.798±0.079	0.496±0.013	3.60±0.011
V1T21	0.641	0.426	2.75
	0.667	0.437	3.02
	0.653	0.430	2.79
	0.654±0.013	0.431±0.006	2.85±0.015
V1P17	0.478	0.446	2.68
	0.477	0.449	2.68
	0.482	0.447	2.70
	0.479±0.003	0.447±0.002	2.69±0.011
V1T17	0.442	n.d.	2.22
	0.439	n.d.	2.21
	0.446	n.d.	2.22
	0.442±0.004	n.d.	2.22±0.005

Tabla 69. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 4 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O-glucósido	Cianidín-3-O-glucósido	Malvidín-3-O-glucósido
V2P21	0.715	0.491	6.47
	0.898	0.480	5.57
	0.861	0.473	6.09
	0.825±0.096	0.481±0.009	6.04±0.448
V2T21	1.12	n.d.	4.86
	1.13	n.d.	4.81
	1.14	n.d.	4.73
	1.13±0.007	n.d.	4.80±0.066
V2P17	0.825	0.953	5.80
	0.824	0.934	5.86
	0.808	0.940	5.79
	0.819±0.010	0.942±0.010	5.82±0.036
V2T17	0.835	0.637	4.48
	0.830	0.641	4.45
	0.836	0.650	4.51
	0.834±0.003	0.643±0.007	4.48±0.033

Tabla 70. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 8 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-<i>O</i>-glucósido	Cianidín-3-<i>O</i>-glucósido	Malvidín-3-<i>O</i>-glucósido
V1P21	0.672 0.674 0.671 0.672±0.002	n.d. n.d. n.d. n.d.	3.54 3.54 3.55 3.54±0.004
V1T21	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.	1.34 1.34 1.32 1.33±0.008
V1P17	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.	2.62 2.61 2.60 2.61±0.007
V1T17	0.537 0.536 0.526 0.533±0.006	n.d. n.d. n.d. n.d.	1.57 1.55 1.56 1.56±0.011

Tabla 71. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 8 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido
V2P21	0.586	n.d.	4.91
	0.565	n.d.	5.11
	0.569	n.d.	5.22
	0.573±0.011	n.d.	5.08±0.160
V2T21	n.d.	n.d.	1.92
	n.d.	n.d.	1.91
	n.d.	n.d.	1.88
	n.d.	n.d.	1.90±0.024
V2P17	0.530	0.543	3.21
	0.555	0.577	3.14
	0.542	0.569	3.18
	0.543±0.013	0.563±0.018	3.18±0.035
V2T17	n.d.	n.d.	1.01
	n.d.	n.d.	0.997
	n.d.	n.d.	0.974
	n.d.	n.d.	0.992±0.016

Tabla 72. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 12 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido
V1P21	n.d.	n.d.	2.32
	n.d.	n.d.	2.31
	n.d.	n.d.	2.29
	n.d.	n.d.	2.31±0.012
V1T21	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
V1P17	n.d.	n.d.	2.18
	n.d.	n.d.	2.23
	n.d.	n.d.	2.24
	n.d.	n.d.	2.22±0.034
V1T17	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 73. Concentración de derivados glucósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 12 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3- <i>O</i> -glucósido	Cianidín-3- <i>O</i> -glucósido	Malvidín-3- <i>O</i> -glucósido
V2P21	n.d.	n.d.	2.68
	n.d.	n.d.	2.74
	n.d.	n.d.	2.68
	n.d.	n.d.	2.70±0.033
V2T21	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
V2P17	n.d.	n.d.	1.68
	n.d.	n.d.	1.66
	n.d.	n.d.	1.66
	n.d.	n.d.	1.67±0.015
V2T17	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 74. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 4 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- arabinósido	Cianidín-3-O- arabinósido	Petunidín-3-O- arabinósido	Malvidín-3-O- arabinósido
V1P21	0.649	1.38	0.909	3.96
	0.641	1.21	0.946	3.94
	0.638	1.34	0.917	3.93
	0.643±0.005	1.31±0.092	0.924±0.020	3.94±0.019
V1T21	0.450	0.966	0.508	3.06
	0.434	1.32	0.577	3.80
	0.447	1.19	0.533	3.37
	0.444±0.008	1.17±0.192	0.540±0.035	3.41±0.370
V1P17	0.827	0.740	0.907	3.83
	0.831	0.733	0.898	3.83
	0.835	0.730	0.904	3.86
	0.831±0.004	0.734±0.005	0.903±0.004	3.84±0.016
V1T17	n.d.	0.770	n.d.	3.24
	n.d.	0.774	n.d.	3.26
	n.d.	0.909	n.d.	2.47
	n.d.	0.818±0.079	n.d.	2.99±0.450

Tabla 75. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 4 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- arabinósido	Cianidín-3-O- arabinósido	Petunidín-3-O- arabinósido	Malvidín-3-O- arabinósido
V2P21	0.696 0.710 0.689 0.698±0.011	0.610 0.614 0.629 0.618±0.010	0.982 1.22 1.06 1.09±0.124	7.21 8.76 8.22 8.06±0.783
V2T21	n.d. n.d. n.d. n.d.	1.86 1.86 1.85 1.86±0.005	n.d. n.d. n.d. n.d.	6.72 6.69 6.78 6.73±0.005
V2P17	0.770 0.778 0.782 0.777±0.006	1.55 1.55 1.55 1.55±0.003	1.16 1.19 1.16 1.17±0.017	5.06 4.76 4.86 4.89±0.157
V2T17	0.653 0.649 0.655 0.652±0.003	1.47 1.47 1.47 1.47±0.004	0.871 0.861 0.858 0.863±0.007	5.29 5.27 5.22 5.26±0.032

Tabla 76. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 8 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- arabinósido	Cianidín-3-O- arabinósido	Petunidín-3-O- arabinósido	Malvidín-3-O- arabinósido
V1P21	n.d.	1.82	n.d.	2.60
	n.d.	1.80	n.d.	2.60
	n.d.	1.85	n.d.	2.61
	n.d.	1.83±0.027	n.d.	2.60±0.003
V1T21	n.d.	n.d.	n.d.	1.01
	n.d.	n.d.	n.d.	1.01
	n.d.	n.d.	n.d.	1.03
	n.d.	n.d.	n.d.	1.02±0.009
V1P17	n.d.	0.863	n.d.	4.00
	n.d.	0.860	n.d.	4.00
	n.d.	0.856	n.d.	3.97
	n.d.	0.860±0.004	n.d.	3.99±0.017
V1T17	n.d.	0.743	n.d.	2.11
	n.d.	0.750	n.d.	1.95
	n.d.	0.748	n.d.	2.03
	n.d.	0.747±0.004	n.d.	2.03±0.081

Tabla 77. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 8 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- arabinósido	Cianidín-3-O- arabinósido	Petunidín-3-O- arabinósido	Malvidín-3-O- arabinósido
V2P21	0.476 0.470 0.467 0.471±0.005	1.42 1.44 1.41 1.42±0.016	0.965 0.901 0.948 0.938±0.033	4.53 4.59 4.51 4.54±0.039
V2T21	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.	0.772 0.785 0.780 0.779±0.007	1.96 2.08 2.04 2.03±0.059
V2P17	0.560 0.563 0.564 0.563±0.002	0.992 1.11 1.08 1.06±0.060	0.730 0.777 0.744 0.750±0.024	n.d. n.d. n.d. n.d.
V2T17	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.	0.946 0.926 0.908 0.927±0.019

Tabla 78. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 12 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- arabinósido	Cianidín-3-O- arabinósido	Petunidín-3-O- arabinósido	Malvidín-3-O- arabinósido
V1P21	n.d.	n.d.	n.d.	1.83
	n.d.	n.d.	n.d.	1.76
	n.d.	n.d.	n.d.	1.76
	n.d.	n.d.	n.d.	1.78±0.040
V1T21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V1P17	n.d.	n.d.	n.d.	1.92
	n.d.	n.d.	n.d.	1.90
	n.d.	n.d.	n.d.	1.92
	n.d.	n.d.	n.d.	1.91±0.012
V1T17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 79. Concentración de derivados arabinósidos (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 12 meses de envejecimiento en botella.

	Delfinidín-3-O- arabinósido	Cianidín-3-O- arabinósido	Petunidín-3-O- arabinósido	Malvidín-3-O- arabinósido
V2P21	n.d.	n.d.	n.d.	2.71
	n.d.	n.d.	n.d.	2.70
	n.d.	n.d.	n.d.	2.68
	n.d.	n.d.	n.d.	2.70±0.013
V2T21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V2P17	n.d.	n.d.	n.d.	1.31
	n.d.	n.d.	n.d.	1.30
	n.d.	n.d.	n.d.	1.29
	n.d.	n.d.	n.d.	1.30±0.013
V2T17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 80. Concentración de malvidina (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 a los 4, 8 y 12 meses de envejecimiento en botella.

	4 Meses	8 Meses	12 Meses
V1P21	0.788	0.945	n.d.
	0.719	0.917	n.d.
	0.745	0.933	n.d.
	0.751±0.036	0.932±0.015	n.d.
V1T21	0.643	n.d.	n.d.
	0.734	n.d.	n.d.
	0.666	n.d.	n.d.
	0.681±0.048	n.d.	n.d.
V1P17	0.800	0.855	n.d.
	0.817	0.838	n.d.
	0.809	0.830	n.d.
	0.809±0.010	0.841±0.014	n.d.
V1T17	0.564	0.564	n.d.
	0.552	0.544	n.d.
	0.535	0.550	n.d.
	0.550±0.016	0.553±0.011	n.d.

Tabla 81. Concentración de malvidina (mg/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 2 a los 4, 8 y 12 meses de envejecimiento en botella.

	4 Meses	8 Meses	12 Meses
V2P21	1.18 1.08 1.20 1.15±0.067	1.06 1.16 1.14 1.12±0.053	n.d. n.d. n.d. n.d.
V2T21	0.945 0.937 0.942 0.941±0.005	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.
V2P17	1.06 1.05 1.05 1.05±0.005	0.754 0.777 0.758 0.763±0.013	n.d. n.d. n.d. n.d.
V2T17	0.715 0.710 0.706 0.711±0.006	n.d. n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d. n.d.

Tabla 82. Evolución de los valores actividad antioxidante (mmol TE/L) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 y 2.

	4 Meses			8 Meses			12 Meses			4 Meses			8 Meses			12 Meses		
V1P21	4.97			6.06			6.87			7.50			7.50			7.50		
	5.00			6.36			6.34			7.57			7.89			8.37		
	4.95			6.05			6.71			7.50			7.54			8.57		
	4.98±0.027			6.16±0.179			6.64±0.275		V2P21	7.52±0.040			7.64±0.214			8.69±0.399		
V1T21	4.33			4.88			6.59			6.89			7.24			8.61		
	4.84			5.16			6.15			7.16			7.71			8.10		
	4.56			5.30			6.15			6.72			7.59			7.72		
	4.58±0.256			5.11±0.214			6.30±0.254		V2T21	6.92±0.226			7.51±0.241			8.14±0.444		
V1P17	3.73			5.16			5.76			5.99			5.87			6.39		
	4.39			5.07			5.12			6.15			6.00			6.83		
	4.40			5.75			5.74			5.67			6.02			6.55		
	4.17±0.380			5.33±0.367			5.54±0.538		V2P17	5.94±0.247			5.97±0.082			6.59±0.224		
V1T17	3.95			5.26			6.19			5.50			5.69			5.95		
	4.19			5.67			5.77			5.97			5.86			6.32		
	4.04			5.32			5.12			5.48			5.69			6.30		
	4.06±0.121			5.42±0.223			5.69±0.538		V2T17	5.65±0.278			5.75±0.097			6.19±0.206		

Tabla 83. Evolución de los valores de absorbancia a 420 nm (u.a.) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 y 2.

	4 Meses		8 Meses		12 Meses		4 Meses		8 Meses		12 Meses	
V1P21	0.084		0.095		0.089		V2P21		0.136		0.139	
	0.089		0.096		0.089				0.136		0.139	
	0.085		0.096		0.089				0.136		0.138	
	0.086±0.003		0.096±0.000		0.089±0.000				0.136±0.000		0.139±0.000	
												0.142±0.001
V1T21	0.118		0.141		0.099		V2T21		0.161		0.161	
	0.12		0.141		0.100				0.160		0.161	
	0.123		0.141		0.100				0.162		0.161	
	0.120±0.003		0.141±0.000		0.100±0.000				0.161±0.001		0.161±0.000	
												0.148±0.000
V1P17	0.075		0.069		0.066		V2P17		0.123		0.117	
	0.078		0.069		0.069				0.127		0.116	
	0.075		0.069		0.068				0.129		0.116	
	0.076±0.002		0.069±0.000		0.067±0.001				0.126±0.003		0.117±0.000	
												0.125±0.002
V1T17	0.101		0.090		0.089		V2T17		0.133		0.126	
	0.102		0.093		0.088				0.135		0.130	
	0.103		0.089		0.086				0.134		0.128	
	0.102±0.001		0.090±0.002		0.087±0.001				0.134±0.001		0.128±0.002	
												0.135±0.002

Tabla 84. Evolución de los valores de absorbancia a 520 nm (u.a.) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 y 2.

	4 Meses	8 Meses	12 Meses		4 Meses	8 Meses	12 Meses
V1P21	0.093 0.095 0.093 0.094±0.001	0.107 0.107 0.106 0.106±0.001	0.094 0.094 0.094 0.094±0.000	V2P21	0.143 0.144 0.143 0.143±0.001	0.165 0.165 0.165 0.165±0.000	0.160 0.158 0.158 0.159±0.001
V1T21	0.137 0.139 0.139 0.138±0.001	0.140 0.140 0.139 0.140±0.000	0.114 0.114 0.114 0.114±0.000	V2T21	0.151 0.152 0.151 0.151±0.001	0.162 0.160 0.161 0.161±0.001	0.147 0.147 0.147 0.147±0.000
V1P17	0.065 0.065 0.066 0.065±0.001	0.064 0.063 0.063 0.064±0.000	0.056 0.058 0.056 0.056±0.001	V2P17	0.139 0.134 0.135 0.136±0.002	0.126 0.126 0.126 0.126±0.000	0.139 0.134 0.135 0.136±0.002
V1T17	0.079 0.078 0.079 0.079±0.001	0.086 0.080 0.086 0.084±0.003	0.073 0.071 0.070 0.071±0.001	V2T17	0.128 0.130 0.128 0.129±0.001	0.121 0.125 0.123 0.123±0.002	0.128 0.130 0.120 0.126±0.005

Tabla 85. Evolución de los valores de absorbancia a 620 nm (u.a.) (valores, media y desviación estándar) de los vinos 1 y 2.

	4 Meses		8 Meses		12 Meses		4 Meses		8 Meses		12 Meses	
V1P21	0.015		0.031		0.024							
	0.017		0.031		0.024		V2P21	0.026	0.044	0.042		
	0.016		0.032		0.024			0.026	0.044	0.041		
	0.016±0.001		0.031±0.000		0.024±0.000			0.026±0.001	0.044±0.000	0.041±0.000		
V1T21	0.026		0.049		0.023		V2T21	0.033	0.038	0.033		
	0.028		0.049		0.020			0.033	0.038	0.033		
	0.026		0.048		0.020			0.032	0.038	0.033		
	0.027±0.001		0.049±0.000		0.021±0.002			0.033±0.001	0.038±0.000	0.033±0.000		
V1P17	0.012		0.018		0.005		V2P17	0.020	0.026	0.020		
	0.012		0.018		0.008			0.018	0.026	0.020		
	0.011		0.018		0.006			0.019	0.026	0.020		
	0.012±0.001		0.018±0.000		0.006±0.001			0.019±0.001	0.026±0.000	0.020±0.000		
V1T17	0.020		0.026		0.013		V2T17	0.019	0.018	0.019		
	0.020		0.026		0.011			0.019	0.017	0.019		
	0.021		0.026		0.010			0.019	0.017	0.018		
	0.020±0.001		0.026±0.000		0.011±0.002			0.019±0.000	0.017±0.000	0.019±0.001		

Tabla 86. Valores de coordenadas del espacio Cielab y absorbancias a 420 y 520 nm (valores, media y desviación estándar) de los extractos obtenidos con diferentes intensidades de ultrasonidos.

UI	L	a*	b*	A ₅₂₀	A ₄₂₀
0	77.3	22.0	7.94	0.341	0.334
	79.1	22.8	11.0	0.360	0.322
	78.2	22.4	9.46	0.351	0.328
4.4	78.2±0.870	22.4±0.385	9.46±1.52	0.351±0.013	0.328±0.008
	75.6	24.8	10.2	0.366	0.356
	77.1	22.3	9.86	0.379	0.344
9.4	76.4	23.6	10.0	0.368	0.350
	76.4±0.730	23.6±1.29	10.0±0.155	0.372±0.009	0.350±0.009
	75.0	24.9	12.9	0.430	0.418
13.4	75.9	23.6	13.3	0.432	0.418
	75.5	24.2	13.1	0.433	0.418
	75.5±0.430	24.2±0.661	13.1±0.205	0.432±0.002	0.418±0.006
16.7	71.0	29.1	15.5	0.539	0.524
	70.4	29.6	16.1	0.546	0.539
	70.7	29.3	15.8	0.552	0.531
16.7	70.7±0.305	29.3±0.265	15.8±0.315	0.546±0.009	0.531±0.011
	69.9	29.6	16.2	0.563	0.537
	72.0	29.7	17.0	0.549	0.540
16.7	70.9	29.7	16.6	0.556	0.539
	70.9±1.00	29.7±0.060	16.6±0.405	0.556±0.009	0.540±0.011

Tabla 87. Concentración de flavonoles (mg/100 g de quercetina) (valores, media y desviación estándar) obtenidos con diferentes intensidades de ultrasonidos.

UI (W.cm ⁻²)	Quercetina
0	1.32
	1.12
	1.22
	1.22±0.140
4.4	1.25
	1.36
	1.31
	1.31±0.078
9.4	1.60
	1.25
	1.32
	1.39±0.268
13.4	1.54
	1.59
	1.57
	1.57±0.037
16.7	1.35
	1.44
	1.40
	1.40±0.062

Tabla 88. Concentración de derivados galactósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en los extractos obtenidos con las diferentes intensidades de ultrasonidos.

UI (W.cm ⁻²)	Delfinidín-3-O- galactósido	Cianidín-3-O- galactósido	Petunidín-3-O- galactósido	Peonidín-3-O- galactósido	Malvidín-3-O- galactósido
0	33.7	71.6	23.6	11.2	66.5
	34.8	70.6	24.2	11.2	67.1
	35.9	69.6	23.0	11.1	67.8
	34.8±1.54	70.6±1.41	23.6±0.820	11.1±0.299	67.1±0.932
4.4	4.56	37.3	4.95	1.91	51.5
	5.48	37.2	5.64	2.56	50.4
	4.56	37.3	4.95	1.28	49.4
	4.87±0.867	37.3±0.104	5.18±0.658	1.92±0.907	50.4±1.42
9.4	7.73	40.6	6.62	3.64	56.3
	9.88	43.3	8.66	4.37	57.9
	8.81	42.0	7.64	4.01	57.1
	8.81±1.52	42.0±1.91	7.64±1.45	4.01±0.515	57.1±1.11
13.4	11.8	53.4	10.2	3.75	66.0
	11.9	52.9	10.2	2.98	65.9
	11.9	52.5	10.2	2.21	65.9
	11.9±0.122	52.9±0.639	10.2±0.064	2.98±1.06	65.9±0.046
16.7	14.7	56.9	11.5	6.30	62.3
	15.5	57.9	11.7	6.39	63.0
	15.1	58.9	11.6	6.36	63.0
	15.1±0.550	57.9±1.40	11.6±0.147	6.35±0.069	62.8±0.731

Tabla 89. Concentración de derivados glucósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en los extractos obtenidos con las diferentes intensidades de ultrasonidos.

UI (W.cm ⁻²)	Delfinidín-3-O-glucósido	Cianidín-3-O-glucósido	Petunidín-3-O-glucósido	Peonidín-3-O-glucósido
0	36.6	76.3	44.3	44.0
	38.4	77.8	46.0	44.6
	36.6	76.3	44.3	44.0
	37.2±1.64	76.8±1.47	44.9±1.54	44.2±0.603
4.4	4.20	47.6	9.91	32.4
	4.20	47.4	11.0	32.4
	5.14	47.3	9.85	32.4
	4.51±0.886	47.4±0.252	9.91±1.51	32.4±1.03
9.4	7.71	55.1	13.3	36.7
	9.26	57.7	16.1	37.5
	9.26	55.1	14.7	37.1
	8.75±1.47	55.9±2.47	14.7±2.01	37.1±0.566
13.4	11.3	69.0	19.4	42.9
	11.5	69.5	20.0	42.8
	11.4	69.2	19.7	42.9
	11.4±0.125	69.2±0.352	19.7±0.436	42.9±0.009
16.7	13.4	64.9	20.7	40.8
	14.0	66.3	20.8	41.6
	13.7	65.6	20.7	41.2
	13.7±0.446	65.6±1.01	20.7±0.100	41.2±0.560

Tabla 90. Concentración de derivados arabinósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en los extractos obtenidos con las diferentes intensidades de ultrasonidos.

UI (W.cm ⁻²)	Delfinidín-3-O-arabinósido	Cianidín-3-O-arabinósido	Petunidín-3-O-arabinósido	Peonidín-3-O-arabinósido	Malvidín-3-O-arabinósido
0	18.5	40.1	12.0	4.80	29.9
	19.9	41.4	12.2	4.85	30.2
	19.2	40.8	12.1	4.82	30.0
	19.2±0.974	40.8±0.961	12.1±0.165	4.82±0.040	30.0±0.217
4.4	n.d.	23.4	7.75	3.69	23.6
	n.d.	22.9	8.44	3.67	22.7
	n.d.	23.2	8.05	3.68	23.0
	n.d.	23.2±0.382	8.15±0.562	3.68±0.014	23.1±0.679
9.4	4.25	26.9	9.20	4.33	26.4
	5.92	29.3	9.52	4.55	27.2
	5.08	28.1	9.36	4.44	26.5
	5.08±1.18	28.1±1.67	9.36±0.227	4.44±0.156	26.7±0.466
13.4	7.41	35.9	9.70	5.12	30.7
	7.41	36.0	8.25	5.32	30.8
	7.42	36.1	8.25	5.32	30.7
	7.42±0.808	36.0±0.255	8.73±1.37	5.26±0.196	30.7±0.045
16.7	8.60	36.1	11.5	4.89	29.3
	8.60	37.2	11.6	5.05	29.7
	8.61	36.6	11.6	4.82	29.4
	8.61±0.253	36.6±0.730	11.6±0.088	4.92±0.181	29.5±0.369

Tabla 91. Concentración de derivados acetilgalactósidos (mg /100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en los extractos obtenidos con las diferentes intensidades de ultrasonidos.

UI (W.cm ⁻²)	Delfinidín-3-(6-acetoil)- galactósido	Cianidín-3-(6-acetoil)- galactósido	Petunidín-3-(6-acetoil)- galactósido	Peonidín-3-(6-acetoil)- galactósido	Malvidín-3-(6 acetoil)- galactósido
0	3.14	1.63	3.79	6.97	21.4
	3.20	1.63	3.89	7.03	21.7
	3.26	1.63	3.69	7.05	21.2
	3.20±0.084	1.63±0.001	3.79±0.141	7.02±0.058	21.4±0.367
4.4	1.92	1.15	0.536	5.01	15.8
	1.95	1.18	0.651	4.87	15.2
	1.93	1.15	0.579	5.17	15.5
	1.94±0.032	1.16±0.032	0.589±0.088	5.02±0.219	15.5±0.426
9.4	2.30	1.34	0.796	5.68	17.0
	2.34	1.39	0.899	5.93	17.4
	2.42	1.28	0.697	5.81	16.0
	2.32±0.169	1.34±0.079	0.797±0.143	5.81±0.180	17.0±0.594
13.4	2.53	1.57	1.06	6.56	18.5
	2.56	1.59	1.05	6.60	18.4
	2.50	1.58	1.05	6.58	18.5
	2.53±0.038	1.58±0.015	1.05±0.009	6.58±0.028	18.5±0.059
16.7	2.35	1.43	1.11	6.02	16.7
	2.40	1.47	1.12	6.11	16.9
	2.37	1.44	1.12	6.05	16.7
	2.37±0.039	1.45±0.036	1.12±0.007	6.06±0.064	16.8±0.121

Tabla 92. Concentración de derivados acetilglucósidos (mg/100 g materia seca) (valores, media y desviación estándar) identificados en los extractos obtenidos con las diferentes intensidades de ultrasonidos.

UI (W.cm ⁻²)	Cianidín-3-(6-acetoi)-glucósido
0	3.35
	3.38
	3.37
	3.37±0.026
4.4	2.63
	2.55
	2.47
	2.55±0.114
9.4	2.83
	2.92
	3.00
	2.92±0.120
13.4	2.98
	3.03
	3.01
	3.01±0.035
16.7	2.71
	2.74
	2.72
	2.73±0.023

Tabla 93. Concentración (mg ácido gálico/g materia seca) (valores, media y desviación estándar) de compuestos fenólicos totales identificados en los extractos obtenidos con las diferentes intensidades de ultrasonidos.

Tiempo (minutos)								
UI (W.cm ⁻²)	5	10	15	20	25	30	45	60
0	6.58	12.2	12.2	12.8	14.2	16.3	16.7	17.3
	6.98	11.0	11.6	12.2	14.1	15.5	16.8	17.4
	6.93	12.2	12.2	12.2	14.2	15.7	16.6	17.4
4.4	6.83±0.218	11.8±0.697	12.0±0.340	12.4±0.355	14.2±0.053	15.9±0.420	16.7±0.092	17.4±0.033
	12.5	13.1	13.3	13.9	14.3	15.9	17.1	19.2
	12.7	13.6	13.6	14.0	15.8	16.8	17.3	19.2
9.4	12.6	13.1	13.4	13.9	15.2	16.5	17.1	19.2
	12.6±0.086	13.3±0.305	13.4±0.155	13.9±0.049	15.1±0.742	16.4±0.457	17.2±0.120	19.2±0.023
	13.9	16.1	16.1	18.7	20.0	21.0	21.8	22.3
13.4	14.7	17.1	17.8	18.5	19.1	19.3	19.2	22.2
	14.0	16.4	17.1	18.7	19.1	20.5	20.5	22.3
	14.2±0.450	16.5±0.003	17.0±0.006	18.6±0.001	19.4±0.003	20.3±0.006	20.5±0.009	22.2±0.001
16.9	12.8	15.4	17.7	18.2	18.8	22.3	23.0	22.6
	14.8	15.8	16.4	16.8	19.0	20.8	22.3	26.9
	13.6	15.6	17.1	17.3	18.9	21.4	22.3	24.1
16.9	13.8±1.01	15.6±0.174	17.0±0.644	17.5±0.716	18.9±0.079	21.5±0.760	22.7±0.423	24.8±2.18
	15.8	15.8	17.5	17.8	18.0	19.4	20.1	25.8
	14.2	17.2	18.6	19.5	19.5	21.0	21.8	26.6
16.9	15.3	16.5	18.0	18.7	18.9	20.4	20.7	25.9
	15.1±0.827	16.5±0.681	18.0±0.578	18.7±0.846	18.8±0.768	20.3±0.837	20.8±0.880	26.1±0.450

Tabla 94. Evolución del rendimiento de extracción de materia seca (valores, media y desviación estándar) en función del tiempo de extracción y de la intensidad de ultrasonidos.

UI (W.cm ⁻²)	Tiempo (minutos)									
	5	10	15	20	25	30	45	60		
0	0.034	0.054	0.075	0.075	0.097	0.109	0.089	0.107		
	0.038	0.070	0.101	0.106	0.087	0.081	0.104	0.093		
	0.038	0.070	0.100	0.106	0.087	0.080	0.104	0.093		
	0.037±0.002	0.065±0.009	0.092±0.015	0.096±0.018	0.090±0.006	0.090±0.017	0.099±0.009	0.097±0.008		
4.4	0.063	0.114	0.115	0.113	0.127	0.099	0.093	0.101		
	0.063	0.114	0.114	0.112	0.126	0.100	0.092	0.102		
	0.064	0.086	0.130	0.133	0.117	0.134	0.125	0.137		
	0.063±0.001	0.105±0.016	0.120±0.008	0.119±0.012	0.123±0.006	0.111±0.020	0.104±0.019	0.113±0.021		
9.4	0.075	0.126	0.133	0.118	0.116	0.144	0.109	0.143		
	0.098	0.104	0.148	0.148	0.146	0.116	0.153	0.134		
	0.098	0.104	0.147	0.147	0.145	0.115	0.152	0.134		
	0.090±0.013	0.105±0.012	0.120±0.008	0.119±0.017	0.123±0.017	0.111±0.016	0.104±0.025	0.113±0.005		
13.4	0.109	0.152	0.171	0.169	0.163	0.150	0.143	0.138		
	0.109	0.152	0.171	0.169	0.163	0.150	0.143	0.138		
	0.108	0.118	0.133	0.146	0.148	0.148	0.157	0.155		
	0.109±0.001	0.141±0.024	0.158±0.027	0.161±0.016	0.158±0.011	0.149±0.001	0.148±0.010	0.144±0.012		
16.7	0.131	0.167	0.181	0.169	0.155	0.166	0.176	0.184		
	0.122	0.138	0.154	0.160	0.170	0.164	0.169	0.179		
	0.122	0.138	0.155	0.160	0.170	0.164	0.169	0.179		
	0.125±0.005	0.148±0.020	0.163±0.019	0.163±0.006	0.165±0.011	0.164±0.001	0.171±0.005	0.181±0.003		

Tabla 95. Valores de absorbancia y valores de inhibición (%AC) de DPPH de los extractos obtenidos a diferentes intensidades de ultrasonidos.

UI (W.cm ⁻²)	Abs 518 nm control	Abs 518 nm dilución 1:5		Abs 518 nm dilución 1:2		Abs 518 nm sin dilución	
		% AC	% AC	% AC	% AC	% AC	% AC
0	0.520	0.000	8.80	0.362	30.4	0.237	54.3
	0.530	0.000	7.50	0.395	25.5	0.235	55.6
	0.524	0.000	7.89	0.378	27.9	0.236	55.0
4.4	0.525±0.005	0.000	8.06	0.378±0.016	27.9	0.236±0.001	55.0
	0.520	0.000	16.8	0.345	33.7	0.185	64.4
	0.530	0.000	20.2	0.342	35.4	0.183	65.4
9.4	0.524	0.000	18.2	0.340	35.2	0.182	65.3
	0.525±0.005	0.000	18.4	0.342±0.002	34.8	0.183±0.002	65.0
	0.520	0.000	20.2	0.313	39.8	0.136	73.9
13.4	0.530	0.000	22.0	0.328	38.1	0.137	74.2
	0.524	0.000	21.4	0.319	39.2	0.136	74.0
	0.525±0.005	0.000	21.2	0.320±0.008	39.0	0.136±0.001	74.0
16.7	0.520	0.000	20.2	0.334	35.7	0.110	78.9
	0.530	0.000	20.3	0.246	53.5	0.118	77.8
	0.524	0.000	20.4	0.300	42.8	0.115	78.1
	0.525±0.005	0.000	20.3	0.293±0.044	44.0	0.114±0.004	78.3
	0.520	0.000	19.0	0.279	46.4	0.082	84.3
	0.530	0.000	20.5	0.274	48.3	0.081	84.8
	0.524	0.000	19.7	0.274	47.7	0.081	84.6
	0.525±0.005	0.000	19.7	0.276±0.003	47.5	0.081±0.001	84.6